

1/
154

611.631 (043.2)
PUR
VAL
T

UNIVERSIDAD AUTONOMA DE MADRID

FACULTAD DE MEDICINA

VALORACION CUANTITATIVA DE LAS CELULAS DE LEYDIG EN EL VARICOCELE

Reg. F. M. 8.765

TESIS DOCTORAL

ANA M^a PURAS GIL

1.988

UNIVERSIDAD
AUTONOMA
DE MADRID
FACULTAD DE MEDICINA
BIBLIOTECA

Reunido el Tribunal que suscribe en el día de la
fecha, acordó calificar la presente Tesis Doctoral
con la censura de Apto con laus de
Madrid, 9 Septiembre 1981 unanimidad

Conte

A. Hany G.

Maza

C. I. d.

letra: (b)



UNIVERSIDAD AUTONOMA DE MADRID

FACULTAD DE MEDICINA

DEPARTAMENTO DE MORFOLOGIA

C/. ARZOBISPO MORCILLO, S/N.
28029 MADRID
(ESPAÑA)

D.MANUEL NISTAL MARTIN DE SERRANO, CATEDRATICO DE HISTOLOGIA Y EMBRIOLOGIA GENERAL DE LA FACULTAD DE MEDICINA, DE LA UNIVERSIDAD AUTONOMA DE MADRID, Y JEFE DE SECCION DEL DEPARTAMENTO DE ANATOMIA PATOLOGICA DEL HOSPITAL "LA PAZ",

CERTIFICA:

Que Dña. Ana M^a Puras Gil, Jefe del Servicio de Anatomía Patológica del Hospital "Virgen del Camino", de Pamplona, ha realizado bajo mi dirección el trabajo titulado "Valoración cuantitativa de las células de Leydig en el Varicocelo", que reúne, a mi juicio plenamente, los requisitos para ser presentado como Tesis Doctoral.

En Madrid, a 30 de Mayo de 1988.

AGRADECIMIENTOS

Al Profesor Manuel Nistal, Director de esta Tesis, compañero y amigo, quien con sus conocimientos, dedicación y - enorme ayuda ha contribuido definitivamente a la realización de este trabajo.

Al Profesor Alberto Anaya, mi maestro, que me enseñó a - amar la Patología y en quién siempre he encontrado apoyo.

Al Doctor José M^a Ezpeleta, mi marido, por su ayuda bibliográfica y estímulo constante para terminar esta Tesis.

A mis hijos, Ana, Aránzazu y Miguel, mi agradecimiento por su comprensión y colaboración en el manuscrito.

A los Doctores Félix Contreras, Jesús Lázaró, Simón Marina y Javier Regadera, amigos que con su aportación técnica, han contribuido a la realización de esta Tesis.

A los Doctores Teresa de Pedro y Jesús García de Jalón, - compañeros, que han realizado la valoración estadística.

A todos mis compañeros de trabajo, Frasi Díaz de Rada, - Conchita de Miguel, Federico García-Bragado, Rosa Guarch, Antonio López Unzu, Marta Montes, Begoña Repáraz y Yerani Ruiz de Azúa, por su diaria colaboración.

A todo el personal del Servicio de Anatomía Patológica del Hospital "Virgen del Camino" de Pamplona y sobre todo a - Fermín Mateo, por su ayuda inestimable en la Sala de Autopsias y en el laboratorio de fotografía, a Juli Primo que -

tantas veces ha ordenado, en estos años, el material, a Maite Enmanuel, por su colaboración en la preparación de los testículos de autopsia, a Gemma Arrondo e Isabel Valencia por las tinciones especiales, a Milagros Agorreta, quien me dedicó su tiempo para mecanografiar el manuscrito múltiples veces; en fin a todas las que han colaborado de alguna manera en este trabajo, Ana Arellano, M^a José Equiza, M^a Angeles Litro, Floren Martínez, - Juli Roncal y M^a Jesús Soto.

A todos, gracias.

A mis padres

A Josecho

A Ana, Aránzazu y Miguel

INDICE

	<u>Pag.</u>
1.- <u>INTRODUCCION</u>	1
1.1. GENERALIDADES	2
1.1.1. Incidencia	2
1.1.2. Clasificación clínica	3
1.1.3. Bases anatómicas	4
1.1.4. Etiología	6
1.2. MECANISMOS PATOGENETICOS DE LAS LESIONES TESTICULARES	9
1.3. LESIONES DEL EPITELIO SEMINIFERO EN EL VARICOCELE	22
1.4. ALTERACIONES DEL INTERSTICIO EN EL VARICOCELE	28
1.4.1. Vasos, intersticio y túnica albugínea	28
1.4.2. Célula de Leydig	29
2.- <u>OBJETIVOS</u>	31
3.- <u>MATERIAL Y METODOS</u>	34
3.1. MATERIAL	35
3.1.1. Material de biopsia	35
3.1.2. Material de autopsia	35

	<u>Pag.</u>
3.2. METODOS	37
3.2.1. Metodología en las biopsias testiculares	37
3.2.2. Metodología en los testículos de autopsia	41
3.2.3. Metodología morfométrica	42
3.2.4. Métodos estadísticos	43
4.- <u>RESULTADOS</u>	46
4.1. MATERIAL DE BIOPSIAS	47
4.2. MATERIAL DE AUTOPSIAS	49
4.3. ICONOGRAFIA	64
5.- <u>DISCUSION</u>	71
6.- <u>CONCLUSIONES</u>	89
7.- <u>RESUMEN</u>	91
8.- <u>BIBLIOGRAFIA</u>	94

1.- INTRODUCCION

1. INTRODUCCION.

1.1. GENERALIDADES.

1.1.1. Incidencia.

El Varicoccele, dilatación y elongación de las venas del plexo pampiniforme, es una lesión propia de la persona humana y no se ha descrito en ninguna otra especie animal; la posición erecta del hombre predispone a ello. La incidencia en la población masculina general oscila entre un 8% y un 23% (20,146); es más frecuente en fumadores que en no fumadores, pero su incidencia es muy superior en pacientes estudiados por infertilidad, oscilando entre un 10% (80) y un 39% (33). El testículo izquierdo está mucho más frecuentemente afectado, entre un 70% y un 100%; la afectación bilateral se da entre un 0% y un 23% y el Varicoccele exclusivamente del lado derecho es raro, entre 0% y 9% (13,65); esta clara predilección por el lado izquierdo es, para algunos autores, absoluta, no admitiendo el Varicoccele derecho más que en casos de anomalías morfológicas como en el "situs inversus" (15) ó en casos de variaciones anatómicas del plexo espermático derecho (desembocadura de la vena espermática interna derecha en la vena renal derecha) (25). La clara preferencia por el lado izquierdo se basaría en las características anatómicas del plexo venoso espermático de ese lado.

Ya en la edad escolar se puede presentar el Varicocele (60,66,100,122), cuya incidencia oscila entre un 12 y un 16% con una mayor afectación de niños de edad comprendida entre los 14 y los 15 años (35,138).

El Varicocele no es una lesión exclusiva del sexo masculino; también se han descrito en la mujer casos de Varicocele tubo-ovárico (28), ya que se cree que existen condiciones análogas en ambos sexos, a nivel de Varicocele masculino y de varicosidades pélvicas femeninas, siendo éstas más frecuentes en mujeres multíparas, debido a la distensión de los plexos venosos pélvicos durante el embarazo.

1.1.2. Clasificación clínica.

La dificultad de medir exactamente el grado de insuficiencia venosa es bien conocida. Se pueden distinguir los siguientes grados de Varicocele (33):

Grado I: Pequeño Varicocele. El tamaño no es superior a 1 cm.

al realizar la palpación tras la maniobra de Valsalva.

Grado II: Varicocele moderado. Tamaño entre 1-2 cms..

Grado III: Gran Varicocele. Se palpa plexo venoso de más de 2 cms. de diámetro. Las venas dilatadas y tortuosas llenan el hemiescroto y es fácilmente visible a distancia.

Un cuarto grado de Varicocele se podría añadir a esta clasificación:

Grado 0 ó Varicocele subclínico: corresponde a aquellos casos en los que existe un reflujo de la vena espermática sin dilatación del plexo pampiniforme. Cuando la exploración escrotal sea dudosa, el varicocele subclínico se definirá por la existencia de alteraciones en el seminograma (65).

Respecto a la relación del Varicocele con la infertilidad, ya en 1.880, Barfield (42) llamó la atención por primera vez, sobre el Varicocele como una de las posibles causas de infertilidad masculina; fué posteriormente Tulloch (144) quien estableció la relación entre Varicocele y esterilidad. Sin embargo, existen opiniones contradictorias al respecto, ya que mientras en algunos estudios no se comprobó una mayor incidencia de Varicocele en los sujetos infértiles, con respecto a la población general, para otros, el Varicocele es la primera causa de infertilidad masculina en varones sanos; así se ha llegado a afirmar que la "infertilidad idiopática" equivaldría al concepto de varicocele subclínico (42).

1.1.3. Bases anatómicas.

El drenaje testicular venoso se lleva a cabo a través de tres venas profundas: la vena espermática interna (vena

testicular); la vena deferencial y la vena espermática externa (vena cremastérica); y, secundariamente, a través de un sistema venoso superficial y que está formado por la vena escrotal anterior y por la posterior que desembocan en la vena safena.

Hay abundantes anastomosis entre los sistemas venosos superficiales y profundos.

El drenaje de la vena espermática interna es diferente en el lado derecho que en el izquierdo. La vena espermática derecha desemboca en la vena cava por debajo de la vena renal formando un ángulo de 30° a 40° . La vena espermática izquierda es más larga (unos 42 cms. de longitud) y desemboca en la vena renal de ese lado y casi en ángulo recto. Su desembocadura se realiza, habitualmente, enfrente de la desembocadura de la vena suprarrenal izquierda. Además, las venas espermáticas del lado izquierdo difieren en varios aspectos estructurales del lado derecho. Mientras las venas del lado derecho tienen dos válvulas en el ostium, el 40% de las venas espermáticas izquierdas carecen de ellas y en un 10% de los casos, aunque están presentes, son insuficientes. Estos hechos permiten deducir que, en algún momento de la vida, en uno de cada dos hombres existe un reflujo, aunque ello no conlleve necesariamente un Varicocele. Las anastomosis entre las diferentes venas espermáticas, son observadas no infrecuentemente en el lado izquierdo. A lo largo de su curso, la vena espermática interna puede anastomosarse con las venas de la cápsula renal,

con la vena lumbar ascendente, las venas de la pared abdominal, la vena pudenda externa y a través de ellas, con la ilíaca y sus venas contralaterales. La vena espermática externa (vena cremastérica) drena, vía canal inguinal, dentro de la vena epigástrica inferior que a su vez drena cerca de la porción final de la vena femoral (94). La vena deferencial emerge del plexo deferencial formado por pequeñas venas en relación con el conducto deferente; se dirige a la vena vesical superior, la cual termina en la vena ilíaca interna o hipogástrica.

1.1.4. Etiología.

Debido a las peculiaridades de la vena espermática izquierda, es precisamente en este lugar en el que se presenta el mayor número de Varicocelos. Las posibles causas para el Varicocelo izquierdo son:

- 1) Ausencia congénita de las válvulas o que sean inadecuadas o insuficientes.
- 2) Debilidad heredada o congénita del tejido conectivo de la pared vascular que predispone a la ectasia venosa.
- 3) Presión hidrostática alta de la vena espermática izquierda debida a su mayor longitud.
- 4) Malas condiciones de drenaje de la vena espermática izquierda por su unión en ángulo recto con la vena renal.
- 5) Alteración del conjunto fascio-muscular del cordón

espermático.

Otras causas pueden ser añadidas a las anteriores; presión más alta de la vena renal que en la cava; presión extrínseca originada por un agrandamiento de los ganglios linfáticos; defecto en el músculo cremastérico debido a una atonía escrotal congénita.

Diferentes causas pueden actuar en cada caso.

El Varicocelo puede fácilmente ocurrir de la siguiente manera: la pérdida o insuficiencia de las válvulas del ostium puede llevar a un reflujo en la vena espermática agravado por el drenaje de la vena suprarrenal que ocurre justo a la misma altura, también en la vena renal.

Este reflujo dilata y alarga el plexo pampiniforme. Si la dilatación es persistente se producen cambios en las paredes de los vasos sanguíneos. Las fibras elásticas se fragmentan y disminuyen y se produce una hipertrofia de la túnica media de la pared de las venas. Al final ocurre una dilatación venosa con el consiguiente efecto negativo sobre la función epididimaria y testicular.

Hasta hace unos años el único factor etiológico que se aceptaba que contribuía a la formación del Varicocelo, era un mecanismo patogenético basado en el reflujo de la vena esper-

mática. Sin embargo, el aumento sufrido en la práctica de la flebografía, asociado al fallo en el tratamiento llevado a cabo con la ligadura de la vena espermática, ha puesto de relieve que algunos Varicoceles son debidos más a reflujo íleo-espermático que a reflujo reno-espermático. Las numerosas anastomosis entre las venas deferenciales e hipogástricas y las venas escrotal y safena soportan esta hipótesis. En ausencia de reflujo reno-espermático, la causa del Varicocele puede ser el reflujo íleo-espermático (94).

Las posibles causas para que ocurra un **Varicocele** en el lado **derecho**, son:

- 1) Tumor renal ó de otro órgano que crezca en retroperitoneo.
- 2) Desembocadura anómala de la vena espermática derecha en la vena renal.
- 3) "Situs inversus".

Por último, para que exista un **Varicocele bilateral**, posiblemente tendrá que haber:

- 1) Asociación entre un Varicocele sintomático derecho ó una anormal desembocadura de la vena espermática derecha en la vena renal y/ó un Varicocele en el lado izquierdo.
- 2) Anastomosis entre el plexo pampiniforme derecho e izquierdo, vía venas suprapúbicas.

Diferentes causas, no siempre demostradas o conocidas, pueden actuar en cada caso.

1.2. MECANISMOS PATOGENETICOS DE LAS LESIONES TESTICULARES.

Los mecanismos fisiopatológicos que intentan explicar la aparición de las graves lesiones testiculares en el Varicocele son numerosas y de naturaleza muy variada: Las alteraciones en la termoregulación escrotal; mecanismos de obstrucción de las vías espermáticas intratesticulares; tensión reducida de oxígeno; efectos tóxicos de los metabolitos suprarrenales y/o renales; insuficiencia del eje hipotálamo-hipofiso-gonadal y por último, una alteración en la regulación paracrina testicular.

Alteraciones en la termoregulación escrotal.

La elevación de la temperatura conduce a la alteración de la espermatogénesis tanto en humanos (84, 118, 136) como en animales.

Un estudio de Moore (82) mostró que la implantación peritoneal de los testículos de los roedores produce una degeneración del epitelio germinal a los 20 días, para volver a recuperar la espermatogénesis al colocar el testículo en el escroto. En el hombre se ha demostrado también una gran sensi-

bilidad del epitelio germinal a temperaturas elevadas.

La aplicación de calor local causa hipoespermatogénesis transitoria y también se han objetivado alteraciones testiculares ante la exposición del cuerpo al calor, en cabinas de diatermia, en casos de utilización de saunas, y en individuos que están expuestos a altas temperaturas en el medio laboral. Existe controversia, no obstante, respecto a si hay ó no aumento de temperatura en el testículo con Varicocele; muchos de los últimos estudios en este sentido han sido realizados utilizando la termografía escrotal; estos trabajos demuestran, generalmente, que la temperatura está aumentada en aquellos testículos que se irrigan con unas venas dilatadas (69); Zorogniotti (159) y Mc.Leod (77), observan que pacientes con Varicocele y semen de baja calidad, tienen una temperatura testicular escrotal entre 0,6 °C. y 0,8 °C. por encima de la temperatura testicular escrotal de un hombre normal sin Varicocele. Namiki (84) atribuye la alteración en la espermatogénesis a la acción directa producida por el calor en las células germinales y no a disfunción de las células de Leydig y Sertoli, al menos inicialmente.

Mecanismos de obstrucción de las vías espermáticas intratesticulares.

Las vías espermáticas intratesticulares (rete testis y túbulos rectos) comparten el mediastino testicular, como zona

de paso, con las venas y vasos linfáticos.

Las ramas venosas no corren paralelas a las arterias. Los dos tercios profundos del parénquima testicular drenan a través de las venas centrípetas hacia la rete testis; la parte periférica del testículo drena a través de vasos que se dirigen hacia la superficie y se sitúan en la capa profunda de la albugínea (venas centrífugas). En el Varicocele, hay una intensa dilatación del plexo pampiniforme y también una marcada dilatación de las venas intraparenquimatosas, y, lo que es más importante, de aquellas de la rete testis.

Estas venas muestran lesiones características de las venas varicosas: dilatación de la luz, fibrosis de la pared e hialinización; por todo ello es posible que algunos tubos rectos, e incluso tubos seminíferos, resulten comprimidos. El hallazgo de atrofia focal lobulillar en las biopsias testiculares de pacientes con Varicocele puede tener este origen patogenético (115), por compresión de los primeros segmentos de las vías espermáticas por los troncos venosos ingurgitados que atraviesan el mediastino testicular, cuando existe un Varicocele central o espermático interno.

Reducción de la tensión de oxígeno.

En los pacientes con Varicocele se ha supuesto que los

niveles de oxígeno serían bajos creando una permanente condición de hipoxia (88). Las mediciones de la presión de oxígeno y anhídrido carbónico, así como del ph tomados en la vena espermática interna, tanto en dirección hacia el riñón como en dirección hacia el testículo, no muestran claramente que sean bajas las concentraciones de oxígeno sino que al contrario, estas concentraciones de oxígeno son siempre altas.

Este hecho, aparentemente paradójico, tiene una justificación fisiológica, si se acepta que en gran parte el reflujo de la vena espermática se origina en la vena renal. El riñón recibe aproximadamente un 25% de la sangre bombeada por el corazón y por tanto la concentración de oxígeno en la vena renal será alta.

Efectos tóxicos de los metabolitos suprarrenales y/o renales.

La proximidad de los ostium de la vena suprarrenal y de la vena espermática izquierda en la vena renal sugirió a Mc. Leod (77) que las secreciones suprarrenales pudieran pasar a la vena espermática y dañaran así la espermatogénesis, fundamentalmente por el contenido en hormonas córtico-suprarrenales.

Estudios posteriores llevados a cabo por Comhaire y Vermeulen (24) condujeron a diferentes conclusiones. Estos

autores investigaron el flujo sanguíneo en la vena espermática usando controles sanos y pacientes con Varicocele y midiendo las concentraciones de cortisol y catecolaminas.

Los niveles de cortisol registrados en las venas espermáticas fueron generalmente iguales a aquéllos registrados en las venas periféricas. Cohen (23), encontró catecolaminas elevadas en la sangre de la vena espermática varicosa, comparados con las concentraciones en sangre periférica; pero este trabajo no fué llevado a cabo con controles. Ito (64), en sus trabajos de investigación, encontró unas cifras elevadas de prostaglandinas en la vena espermática, con unas cifras de cortisol normales, por lo que supuso que lo que existía era un reflujo de la vena renal, sin refluir los metabolitos de la vena suprarrenal.

En pacientes con oligospermia de naturaleza no filia-da, se ha demostrado un aumento de serotonina y de ácido-5-hidroxi-indol-acético. La administración de serotonina en ratas provoca la alteración de la función testicular y la perfusión testicular se mejora con antiserotonínicos. Se ha visto, por otro lado, que la serotonina está aumentada en la vena espermática de algunos pacientes con Varicocele (21).

También se ha objetivado que la serotonina inhibe la síntesis androgénica "in vitro" y, puesto que se ha observado un aumento del número de mastocitos en el intersticio testicu-

lar en pacientes infértiles (75) y en pacientes con Varicocele (16,46), la serotonina podría jugar un papel importante en el desarrollo de las lesiones testiculares.

Vemos pues que, en pacientes con Varicocele, podemos encontrar:

- 1) Bajo nivel de cortisol y alto nivel de catecolaminas; en este caso el reflujo procedería, preferentemente, de la vena renal.

- 2) Nivel similar de cortisol al encontrado en otras venas periféricas; en estos casos el reflujo es probablemente debido a reflujo de la vena íleo-espermática.

- 3) Concentraciones de cortisol y catecolaminas más altas que en las venas periféricas; esto sería probablemente porque existe un shunt entre las venas suprarrenales y espermáticas.

Dado que en alguna serie (24) se ha observado una concentración de catecolaminas más alta en la vena espermática que en sangre periférica, se ha sugerido que la noradrenalina podría jugar un papel en la producción de las lesiones testiculares. La noradrenalina sería transferida, por difusión, desde las venas del plexo pampiniforme a las arterias testiculares, lo que provocaría una vasoconstricción crónica de las arteriolas, que llevaría a una disminución en la perfusión testicular.

Insuficiencia del eje hipotálamo-hipofiso-gonadal

Las concentraciones de testosterona en suero en los pacientes con Varicocele suelen ser normales (24,114) aunque hay observaciones contrapuestas (121,131,147,158).

Por otro lado, Swerdloff y Walsh, en 1.975 (139), midieron la FSH y LH, testosterona y estradiol en sangre periférica y en la vena testicular, en enfermos con Varicocele y en un grupo control sano y no se encontraron diferencias entre ambos grupos, por lo que concluyeron que la función de la célula de Leydig y de la hipofisis era normal. Pero no obtuvo los mismos resultados en sus trabajos Weiss en 1.978 (152), que encontró una cantidad significativamente menor de testosterona intratesticular en aquellos pacientes con Varicocele. Otros autores (9,40,110,129,158) observaron cifras de testosterona menores en sangre periférica respecto a grupos control, en los pacientes con Varicocele por lo que piensan que debe existir una deficiencia en la función de la célula de Leydig. Hudson, en 1.986 (61), encuentra que hombres con Varicocele y un recuento de espermatozoides $< 30 \times 10^6$ /ml. tienen una alteración del eje hipotálamo-hipofiso-gonadal demostrable por una excesiva respuesta a la Gn-RH, altas tasas de prolactina sérica y bajas concentraciones de dihidrotestosterona en plasma seminal.

También Vogt (151) realizó unas mediciones de testos-

terona en sangre periférica, en la vena espermática y en tejido testicular, en pacientes con Varicocele, viendo que no había alteraciones en la función testicular en aquellos pacientes sanos o con Varicocele por debajo de los 40 años; pero sí encontró una disminución de la función en la célula de Leydig, en el hombre sano, entre la sexta y séptima década de la vida y que en el hombre con Varicocele ocurría antes, esta disfunción, aproximadamente, en la edad media de la vida. Trabajos para demostrar la acción que la LH tiene sobre la célula de Leydig, se han llevado a cabo también experimentalmente en ratas (81,123).

Respecto a las cifras de estradiol en sangre existen a su vez discordancias entre los hallazgos de unos autores y otros, en pacientes con Varicocele. Así, Freire y Nahoum (40) obtienen valores por debajo de la normalidad respecto a los grupos control, que interpretan pueda ser debido a una aromatización rápida de la testosterona a estradiol, quizás en la misma célula de Leydig. Este estradiol elevado disminuirá la cifra de testosterona en sangre (73), no sólo por control negativo hipotalámico, sino, también, inhibiendo enzimas desde la célula de Leydig para la síntesis de la testosterona (68). En este sentido resulta interesante el trabajo de Shimp (128), en un enfermo de 24 años, con un tumor de células de Leydig, que presentó ginecomastia y estradiol elevado, junto a una testosterona, LH y FSH descendidas y los de Sirvent (131) de determinación, mediante técnicas de inmunoperoxidasa, de

estradiol en las células de Leydig observando un aumento intracitoplasmático en los casos con Varicocele, respecto al grupo control.

Alteración en la regulación paracrina testicular.

Cada vez se da una importancia mayor a los mecanismos locales reguladores de la espermatogénesis; parece ser que el control de ésta es más complicado de lo que se había supuesto y que depende de la correcta interacción de diferentes tipos celulares intratesticulares: células de Sertoli, germinales, paritubulares, de Leydig y endoteliales (125).

A esta relación se le ha denominado interacción paracrina.

Se sabe que el estado funcional de la célula de Leydig está predominantemente determinado por la secreción de LH, prolactina, y probablemente también por la ACTH. Sin embargo, la integración y la coordinación de las células de Leydig y de la función del tubo seminífero se lleva a cabo a través de interacciones relativamente sofisticadas, reguladores paracrinós y autocrinos, que afectan a numerosos componentes bioactivos de los cuales muchos muestran características similares a los péptidos hormonalmente activos descritos en el sistema nervioso central (140).

Desde hace años se sabe que los andrógenos son necesarios para el funcionamiento normal de las células de Sertoli y para la espermatogénesis en los mamíferos (135).

Hasta hace poco tiempo, la síntesis de la testosterona fue considerada como la única función de las células de Leydig. Actualmente parece evidente que las células de Leydig sintetizan otros productos bio-activos, que son fundamentales para la regulación paracrina y autocrina de la función testicular. Se han localizado péptidos derivados de la pro-opiomelanocortina; la síntesis de ellos parece estar bajo control de la LH (140). Se han detectado en la célula de Sertoli receptores específicos para la beta-endorfina y su funcionamiento parece estar mediado por un mecanismo "adenylatociclasa dependiente". Los estudios de Bardin (7) sugieren que diferentes péptidos pro-opiomelanocortin-derivados tienen efectos opuestos en la función de la célula de Sertoli. En la célula de Leydig también ha sido apreciada actividad "renina-like".

Interacciones diversas, reguladoras, se cree que existen entre las células de Leydig y los tubos seminíferos. Las células mioideas se contraen por la oxitocina testicular que producen las células de Leydig (45); parece ser que dichas células actúan, además, como mediadoras entre los productos secretados por las células de Leydig (beta-endorfina, angiotensina, prostaglandinas, estrógenos, testosterona) y las células de Sertoli; la testosterona que producen aquéllas actúan

en la célula de Sertoli y/o en las células peritubulares (125), siendo necesaria para la espermatogénesis; el mecanismo es desconocido, pero destaca la presencia de más y mayores células de Leydig en vecindad de los tubos en estadios VII-VIII, en ratas, que son los más andrógenos-dependientes del ciclo del tubo seminífero.

Hasta hace poco tiempo se hablaba de que los estrógenos producidos por las células de Sertoli fueran los reguladores entre los tubos y las células de Leydig; sin embargo, estudios posteriores con roedores, han indicado, que la actividad aromatasa en las células de Sertoli está restringida al período de inmadurez y que las células de Leydig son la principal fuente de estrógenos testiculares en el adulto. También se ha visto recientemente que las células de Leydig, en las ratas, poseen receptores estereo-específicos para péptidos "LH-RH-like" (124); se han aislado cantidades de estos péptidos en el testículo y la LH-RH y sus análogos han demostrado tener efectos directos, estimulantes, en una primera fase, e inhibitorios en una segunda fase, sobre la microcirculación testicular, sobre los receptores de LH y sobre la esteroidogénesis. De hecho, se han identificado arginina-vaso-presina (AVP) y oxitocina en glándulas suprarrenales, ovarios y testículos de varias especies, incluido el hombre(141); el hallazgo de gran cantidad de AVP intratesticular en unos ratones, en los que era escasa la cantidad en sangre y en la hipófisis, hizo pensar en la probable síntesis local testicular;

pero la identidad química de estos péptidos no se conoce y existe una considerable variación entre sus pesos moleculares; parece ser que son producidos por la célula de Sertoli, de lo que se deduce el gran control local que esta célula ejerce; no obstante, aunque todas las especulaciones se hacen sobre material de investigación experimental, ratas y ratones (78), es muy probable que el control local de la vascularización en el hombre se efectúe de modo similar. Situaciones en las que se observa un engrosamiento de la pared de los vasos (senilidad, criptorquidia, Varicocele) se acompañan de alteraciones en la espermatogénesis y a nivel de las células de Sertoli y de Leydig (44). Las relaciones entre los tres compartimentos testiculares: tubo seminífero, intersticio y vasos, y el control de la compleja, pero ordenada, secuencia de los acontecimientos que constituyen el ciclo espermatogénico, vendrán determinados por la correcta interacción entre las células endoteliales, las de Leydig, las peritubulares y las de Sertoli.

Muchos de los casos de infertilidad en los hombres ocurren con niveles normales o casi normales de gonadotrofinas y se caracterizan por oligospermia; probablemente sea la mala función de uno o más procesos paracrinós intratesticulares los afectados en esta oligospermia "idiopática".

Los macrófagos intersticiales también están implicados en la regulación paracrina testicular; son, como las células de Leydig, esteroideogénicos y poseen los mismos antígenos de

superficie (140); se ha sugerido, incluso, que sean sus precursores; algunos estudios indican que poseen receptores FSH; también receptores LH, aumentando la capacidad esteroidogénica del testículo. Es posible que algunos efectos de la FSH no se produzcan a través de cambios funcionales en la célula de Sertoli, sino por cambios "FSH-inducidos" en la función macrofágica.

Puesto que todas las interacciones paracrinas que afectan a la célula de Leydig tienen lugar a través del líquido intersticial, los cambios locales en su volumen y en su composición química revisten gran importancia. Hay hormonas (LH, LH-RH, HCG) que actúan sobre la **permeabilidad capilar** (30,59); además, estudios recientes sugieren que el líquido intersticial contiene factores que median y potencian los efectos de la LH en la permeabilidad capilar y en la esteroidogénesis (150); la fuente de estos factores también es desconocida, pero parece que no tengan su origen ni en las células germinales, ni en las células de Leydig, puesto que el factor bioactivo del líquido intersticial está aumentado en tejidos con pérdida de estas células; es posible que su origen esté en la célula de Sertoli y esto contrastaría con otros aspectos conocidos de estas células, como son la producción de líquido del tubo seminífero, de la proteína ligadora de andrógenos y de la inhibina, las cuales disminuyen drásticamente cuando existe disfunción en el tubo seminífero.

Ninguno de estos mecanismos etiopatogénicos pueden realmente convencer en el momento actual ya que existen, como hemos visto, publicaciones con datos dispares, cuando no contradictorios, con frecuencia; no sólo no se sabe cuál es el mecanismo que provoca la alteración testicular en el testículo afecto de Varicocele, sino que, además, todas estas teorías se muestran mucho menos convincentes a la hora de explicar cual es el mecanismo de producción de lesión en el testículo contralateral.

1.3. LESIONES DEL EPITELIO SEMINIFERO EN EL VARICOCELE.

Las alteraciones producidas en el tubo seminífero en el Varicocele han sido estudiadas en profundidad; no parece existir relación entre edad, volumen testicular, localización y grado del Varicocele, y las lesiones que se evidencian en la biopsia testicular (152).

En el tubo seminífero se afecta tanto el epitelio germinal como la lámina propia. Inicialmente no se modifica el diámetro tubular y las lesiones se localizan sólo a nivel del compartimento adluminal de los tubos, mientras que el compartimento basal permanece normal durante un tiempo. Estudios con marcadores como lanthanum han mostrado que la barrera hematotesticular no está alterada en pacientes con Varicocele (18).

La célula de Sertoli se pudiera considerar como la "célula diana" a partir de cuya alteración se producirían las severas lesiones en el epitelio germinal; probablemente la vacuolización apical que se observa en el citoplasma de estas células, la desintegración del citoplasma periluminal que recubre a las espermátides y la degeneración de las uniones espermátide-célula de Sertoli pueden ser expresión de estas lesiones. Para Hofman (54) en la orquipatía por Varicocele, habría dos "células diana":

a) La célula de Sertoli: a través de la afectación de la túnica vascular y la albugínea y por alteración de la contractilidad de esta, se altera el transporte de líquido tubular segregado por la célula de Sertoli y

b) la célula de Leydig: por medio de la alteración de los vasos intratesticulares se altera el intersticio, la célula de Leydig y como consecuencia las células germinales.

La **afectación difusa** del epitelio germinal se ha definido en la literatura bajo tres denominaciones fundamentales: hipoespermatogénesis, parada de la maduración y descamación precoz de elementos inmaduros en la luz tubular (63,94,112); también puede verse binucleación de espermátides (22).

La cuantificación de los diferentes elementos del epitelio germinal, con el objeto de definir exactamente la hipo-

espermatogénesis y la parada de la maduración, se ha llevado a cabo en múltiples trabajos (49,87,94,157,160), en un intento de que exista una definición objetiva de cada uno de estos conceptos; pero ni siquiera hay un acuerdo unánime en cuanto a terminología que no lleve consigo una cierta valoración subjetiva. No obstante, consideraremos como definiciones válidas los conceptos más ampliamente aceptados.

La **hipoespermatogénesis** consiste en una disminución variable (leve, moderada, severa) de la línea germinal y se asocia, con frecuencia, a una desorganización de la secuencia madurativa normal de las capas celulares en el tubo seminífero; se pueden observar también anomalías madurativas de las espermátides y la presencia, en la luz del tubo, de espermatozoides inmaduros de cabeza alargada y base fina.

La disminución del diámetro tubular y el engrosamiento de la túnica propia corren paralelos a la alteración que se evidencia a nivel del epitelio germinal.

La **parada de la maduración** consiste en ausencia de células germinales en la pared del tubo, a partir de un determinado estadio; puede ocurrir parada en espermátides, espermatoцитos e incluso en espermátogonias. Esta alteración ha sido descrita con diferentes nombres: maduración espermatogénica incompleta, parada de la maduración y desprendimiento prematuro de células inmaduras en la luz (55). La distinción entre

las dos alteraciones morfológicas descritas, hipoespermatogénesis y parada de la maduración, no siempre es fácil y a veces ambos conceptos se entremezclan. Recientemente Nistal (97) ha establecido un método sencillo para la distinción entre ellos, haciendo un recuento del número de espermatogonias y del número de espermátides maduras en un número determinado de secciones transversales del tubo seminífero, en una biopsia.

La descamación precoz de elementos inmaduros en la luz tubular, concepto como hemos dicho para algunos autores superponible al anterior de parada en la maduración, suele afectar con mayor frecuencia a espermátides y espermátocitos; progresivamente se establece una pérdida de los diferentes estadios madurativos del epitelio germinal.

El compartimento basal está raramente dañado y según Hofman (54), que realizó un estudio citológico e histométrico, el proceso ocurriría de la siguiente manera: el número de espermatogonias tipo A oscuras disminuiría, siendo esta disminución bilateral, incluso en el lado donde no existe Varicocele; en estadios tempranos las espermatogonias tipo A pálidas, podrían estar por encima de lo normal; este tipo de espermatogonias sobrevive incluso en aquellos Varicoceles de largo tiempo de evolución; en los estadios avanzados podría llegarse a una severa hipoespermatogénesis e incluso se perderían las espermatogonias, permaneciendo sólo las células de Sertoli.

También hay **lesiones focales** en algunos casos, siempre acompañadas de las lesiones difusas anteriormente citadas, especialmente en aquellos testículos con Varicocele de larga evolución (115). Las lesiones focales adoptan un **patrón lobular** siendo las lesiones más frecuentes observadas alteraciones regresivas de las células de Sertoli, dilatación de la luz tubular o atrofas severas que afectan a un grupo de tubos seminíferos pertenecientes al mismo lobulillo; todas ellas entremezcladas con parada de la maduración e hipoespermatogénesis. Este tipo de alteración ha sido denominada por Codesal (22) **patrón en mosaico** y ellos lo han visto en el 50% de los pacientes con Varicocele objeto de estudio. Ya en 1.984 Nistal (93) lo había descrito y el mismo autor, en 1.977 (89), había observado en las biopsias de testículos retráctiles, este patrón de alteración tubular.

La biopsia del testículo contralateral al Varicocele refleja alteraciones histológicas en un elevado porcentaje de casos. En el 90% de los pacientes de algunas series de la literatura, el testículo contralateral presenta alteraciones similares a aquéllas que se observan en el testículo con Varicocele (2,36), aunque habitualmente estas lesiones no son tan intensas. Se ha visto desprendimiento de células inmaduras en la luz y/o parada en la maduración en el 60% de los pacientes. Se ha evidenciado un patrón "en mosaico" en el 20%; y en un 10% las lesiones han sido mínimas.

Los estudios ultraestructurales en el Varicocele son escasos y se centran, preferentemente, también en el tubo seminífero. Las células de Sertoli muestran vacuolización citoplasmática, con dilatación difusa del retículo endoplásmico liso y alteraciones de los complejos de unión Sertoli-célula germinal (17). Las espermatídes, que aparecen mal orientadas en el citoplasma apical de las células de Sertoli, muestran alteraciones de la distribución de la cromatina.

Además, las paredes tubulares presentan un número aumentado de células mioídes y de fibras de colágena, con engrosamiento de la membrana basal.

Vemos, pues, que no existe una imagen específica del Varicocele, aunque todas las lesiones antedichas pueden sugerirla cuando se observan en una biopsia; además, aunque las lesiones son progresivas e irreversibles, la expresividad es muy variable.

Vemos también que, ni tan siquiera, respecto a la nomenclatura, existe un acuerdo unánime puesto que todavía hoy, no se puede llevar a cabo una valoración objetiva de estos tipos de lesión.

1.4. ALTERACIONES DEL INTERSTICIO EN EL VARICOCELE.

1.4.1. Vasos, intersticio y túnica albugínea.

Lesiones vasculares: Las arterias testiculares desarrollan lesiones tanto en la capa íntima como en la capa adventicia. Las lesiones en la íntima, consisten en hiperplasia de las células endoteliales, mientras que en la adventicia se observa una progresiva hialinización.

Las venas muestran dilatación de su luz y una pared engrosada y esclerosa. Estas lesiones son fácilmente identificadas en la túnica vascular del testículo y en las venas mediastínicas y son relativamente bien identificadas en las venas centrífugas y centrípetas, a lo largo de los septos testiculares. La anastomosis arteriovenosas muestran hiperplasia de células mioepiteliales y fibrosis perivascular.

Tejido intersticial: Las lesiones de este tejido son la consecuencia de la congestión crónica. En los estadios iniciales, un marcado edema se añade a las lesiones venosas y se observa un progresivo aumento de la malla reticulínica y de fibras de colágena, llegando a producir esclerosis. Los vasos sanguíneos van siendo rodeados por anillos fibrosos que también engloban a las células de Leydig.

Lesiones en la túnica albugínea: Esta capa muestra

engrosamiento, con marcado edema, a nivel de la túnica vascular; un aumento en el número de vasos venosos, muestra la típica imagen de las lesiones varicosas; se observa también dilatación de los vasos linfáticos y pueden verse acúmulos de células de Leydig e hipertrofia de la capa muscular.

1.4.2. Célula de Leydig.

Las células de Leydig en el Varicocele suelen verse rodeadas individualmente por un fino anillo fibrilar y pueden observarse vacuoladas e hipercromáticas; estos rasgos sugirieron, a algunos autores, que existiría una atrofia de las células de Leydig (2,32). Agger y Johnsen (2) encontraron una densidad celular sólo ligeramente aumentada en el 39% de sus casos de Varicocele; algunos autores han llegado incluso a aceptar que existía una disminución en el número de células de Leydig en el Varicocele (32,52,56,156); pero la mayoría de los autores hablan de que probablemente exista un aumento en el número de células de Leydig, hiperplasia, en el Varicocele, (26,27,32,67,76,130,131,153). Ultraestructuralmente (43) se ha podido observar que existe hipertrofia del citoplasma que es más marcada en aquellos casos en los que existe hiperplasia. El retículo endoplásmico es abundante y hay muchos lípidos, lipofucsina, cristales de Reinke y estructuras paracristalinas (31,117,133), la cromatina se dispone periféricamente y tienen un nucleolo bien desarrollado (11,12,19).

Realmente, si no se lleva a cabo un conteo de las células de Leydig no se puede hablar de si existe aumento o disminución en su número y si no se miden, no se puede hablar de hipertrofia, ya que ambas modificaciones pueden ser aparentes. En cuanto al funcionalismo de estas células, en este tipo de patología, tampoco existe unanimidad en los resultados; así Weissbach (153) y Mc. Fadden (76) creen que los focos de hiperplasia serían consecuencia compensadora de la existencia de otras zonas hipoplásicas, con mala función de la célula de Leydig. Horstein (56) comparte este mismo criterio atribuyendo la hiperplasia a un estímulo gonadotrófico elevado, ante la destrucción celular producida en el Varicocele.

No existe, por tanto una opinión uniforme acerca de si hay o no en el Varicocele una hiperplasia de células de Leydig; por otro lado, hay pocos trabajos de cuantificación celular y en ellos no se ha relacionado el número de células de Leydig con el estadio funcional, lo que hace realmente muy atractivo, emprender un estudio sobre estas células utilizando métodos inmunohistoquímicos, para demostración de testosterona. La cuantificación deberá referirse además, al volumen total testicular ya que se han dado casos en los que se ha aceptado durante muchos años que existía una hiperplasia de células de Leydig, como en el Síndrome de Klinefelter, y que al calcular el número por testículo se ha comprobado que no es real tal aumento (96).

2.- OBJETIVOS

2. OBJETIVOS.

Como no existe relación entre los distintos mecanismos patogenéticos y la presencia de lesión en el testículo, ni con la uni o bilateralidad de los mismos.

Como tampoco hay relación entre el grado y la lesión tubular y como la mayoría de los trabajos se han centrado en el tubo seminífero, no existiendo siquiera en este aspecto un acuerdo unánime sobre el tipo de lesión característica del Varicocele.

Como hemos visto que todavía hay mucha mayor controversia en el papel que las células de Leydig pueden jugar en la patogenia del Varicocele, no sabiendo si existe disminución o aumento o número normal y si su funcionalidad es normal ó está disminuida, hemos pretendido con la presente **TESIS**, abordar el estudio de las células de Leydig desde el punto de vista cuantitativo y cualitativo. Para ello hemos cuantificado el número de células de Leydig por unidad de volumen testicular y por testículo teñidas con técnicas convencionales y mediante técnicas de inmunoperoxidasa, para detectar testosterona intracitoplasmática con el ánimo de esclarecer estos conceptos y por tanto saber si hay una **HIPERPLASIA DE CELULAS DE LEYDIG**, que además sean funcionantes, y que esta hiperplasia pudiera explicar la alteración del tubo seminífero, ya que es bien

conocido que la espermatogénesis es un proceso en el que además de la célula de Sertoli interviene de forma definitiva la célula de Leydig.

3.- MATERIAL Y METODOS

3. MATERIAL Y METODOS.

3.1. MATERIAL.

3.1.1. Material de biopsia.

Se estudiaron 60 biopsias correspondientes a los testículos de 30 pacientes de edad comprendida entre los 25 y los 35 años, que consultaron por esterilidad y en las cuales se evidenció un Varicocele; veinte de los pacientes lo tenían en el lado izquierdo, dos en el derecho, y ocho fueron bilaterales. La procedencia de este material es de diferentes hospitales: Hospital "Virgen del camino" de Pamplona, Hospital "La Paz" de Madrid, Hospital Clínico de Zaragoza, y Centro de Estudio para la Fertilidad (C.E.F.E.R.) de Barcelona. En todos los pacientes existía oligoastenospermia severa.

Cómo grupo control hemos usado el mismo que Nistal empleó, también cómo control, para la cuantificación de las células de Leydig en el Síndrome de Klinefelter (96), y que comprendía ambos testículos de veinte pacientes cuya edad oscilaba entre los 28 y los 36 años y fallecidos sin patología que pudiera afectar al testículo; hemos empleado este grupo, debido a que hemos seguido exactamente la misma sistemática.

3.1.2. Material de autopsia.

Se seleccionaron 24 testículos de autopsia, corres-

pondientes a doce personas fallecidas en el Hospital "Virgen del Camino" de Pamplona, y en las que no había enfermedad hepática, renal o endocrina, ni enfermedades o tratamientos con posible repercusión testicular. Todas las causas de muerte fueron de origen cardíaco o cerebral o correspondían a cuadros de muerte súbita del adulto. Se establecieron dos grupos:

a) Doce testículos, de seis autopsias, de hombres de edad comprendida entre los 25 y los 40 años y en los que, macroscópicamente, se identificó un Varicocele; en cinco de ellos fue izquierdo y en uno de ellos bilateral.

b) Doce testículos, de seis autopsias, de hombres de edad comprendida entre los 61 y 70 años, en los que macroscópicamente se identificó también un Varicocele; en cinco de ellos fue izquierdo y en uno, bilateral.

La expresa separación de ambos grupos de edad, fue llevada a cabo con el fin de establecer un primer grupo en el que no se pudiera detectar otra patología atribuible a involución testicular (5,103,116) y un segundo grupo cuya edad no superara los 70 años, edad en que se considera comienza una más severa hipofunción de las células de Leydig (134). Como grupo control se usó el mismo que en las biopsias, puesto que la metodología llevada a cabo era también similar y en el citado grupo control se habían llevado a cabo recuentos celulares por testículo.

3.2. METODOS

3.2.1. Metodología en las biopsias testiculares.

Las biopsias testiculares fueron realizadas efectuando una incisión siguiendo los pliegues escrotales; a continuación se realizó la apertura del dartos y de la túnica vaginal, con subsiguiente exteriorización del testículo y observación de posibles anomalías. Se tomó una muestra, en cuña, transversal, del borde opuesto al hilio testicular y a continuación se suturó la albugínea con material reabsorbible y se efectuó el cierre por planos; todo ello con anestesia general; se tomó biopsia de ambos testículos y se obtuvieron dos cuñas de 4 x 3 x 2 mm. que incluían albugínea y parénquima testicular; a su vez cada cuña, se dividió en dos fragmentos que se procesaron, respectivamente, para estudio óptico y ultraestructural. Para el primero se utilizó el de mayores dimensiones y se fijó durante 24 horas en fijador de Bouin (14):

- Acido pícrico a saturación en agua destilada 750 c.c
- Formol puro (CH_2O al 40%) 250 c.c
- Acido acético glacial 50 c.c

y se incluyó en parafina, tras retirar el exceso de ácido pícrico en pasos sucesivos por alcohol de 50° y 70°. Los bloques de parafina fueron cortados en un microtomo de rotación tipo Minot a 6,3 micras de promedio, obteniéndose varias lami-

nillas histológicas que se tiñeron, una con hematoxilina-eosina, una con la técnica de Masson y cinco según la técnica de inmunoperoxidasa P.A.P. (Peroxidasa-anti-Peroxidasa) (137) para testosterona, técnica inmunohistoquímica sensible (79), que no precisa equipamiento especial, en la que se mantiene la tinción, y que, en algunos casos, es de mayor sensibilidad que el radioinmunoensayo (58); los pasos seguidos para realizarla fueron, siguiendo a Palacín (101):

1. Desparafinización de secciones: xilol-alcohol.
2. Bloqueo peroxidasa endógena:

H ₂ O ₂ al 0,3% en metanol	30'
--	-----
3. Hidratación progresiva hasta agua destilada.
4. Supresión tinción fondo:

Suero normal de cerdo	45'
-----------------------------	-----
5. Antisuero primario específico:

Suero conejo anti-testosterona humana	20'
---	-----
6. Lavado TRIS SALINO pH 7.2 - 7,6 3 x 10'
7. Antisuero puente:

Suero anti Ig G de conejo en cerdo	20'
--	-----

8. Lavado igual que en 6.
 9. Incubación en PAP de conejo: 20'
 10. Lavado TRIS NO SALINO 0,05 M pH 7.2-7,6 3 x 10'
 11. Revelado de la PEROXIDASA: DAB-4HCL 3 - 7'
 12. Contrastado hematoxilina, deshidratación y montar en DPX,
- (4,5,7 y 9 estaban prediluidos por el fabricante).

En los cortes teñidos con hematoxilina-eosina estudiamos las alteraciones histológicas detectables con microscopía óptica, siguiendo siempre la misma sistemática (111), a nivel de tubos seminíferos e intersticio, comenzando por el tubo seminífero, cuantificando sus componentes (157): espermatogonias, espermatocitos, espermátides inmaduras, espermatozoides y células de Sertoli, midiendo el diámetro tubular y observando las características de la pared tubular y del intersticio.

Los cortes teñidos mediante técnica P.A.P. para testosterona, fueron usados para el recuento de células de Leydig. Se consideraron positivas todas aquellas células con gránulos de color marrón oscuro, oscilando de leve a marcado según fuera tinción débil, grano fino ó grano grueso (70,131).

El fragmento de menor tamaño se prefijó en glutaraldehído al 2,5% disuelto en tampón cacodilato: 0,1 M, pH 7,4. Al cabo de tres a cinco horas de permanencia en fijador, se realizaron dos cambios, en la solución del lavado del tampón cacodilatado y a continuación, se efectuó una post-fijación con tetraóxido de osmio al 0,1%, durante una hora. Para la deshidratación, se pasaron los bloques de tejido por un tampón durante diez minutos y, a continuación, por una escala de etanoles al 70%, quince minutos; etanol al 80%, otros quince minutos; etanol al 95%, quince minutos; etanol al 100% otros quince minutos. A continuación, se sustituyó el etanol al 100% por óxido de propileno y se efectuaron dos cambios de veinte minutos cada uno.

Posteriormente, se sustituyó el óxido de propileno del segundo lavado por una solución, a partes iguales, de óxido de propileno y mezcla completa de resina con acelerador, permaneciendo los fragmentos en esta solución durante una hora. Para su inclusión, se colocaron en cápsulas de gelatina y se rellenaron con la mezcla de resinas Epon 812. La polimerización de la resina se realizó en estufa, en tres fases de doce horas con temperaturas de 35° C, 50° C y 60° C respectivamente. Finalizada la incubación, los bloques resultantes estuvieron listos para ser cortados a partir de las tres horas. El tallado de los bloques se realizó con un ultramicrotomo y los cortes control, de una micra de grosor, se tiñeron con azul de toluidina. Para los cortes ultrafinos se utilizó el mismo ul-

tramicro tomo y las rejillas conteniendo los cortes finos se tiñeron con solución saturada de acetato de uranilo, durante 30 minutos en estufa a 60° C. Posteriormente se lavaron con agua destilada y se procedió a la tinción con citrato de plomo. A continuación fueron vistas en el microscopio electrónico y fotografiadas.

3.2.2. Metodología en los testículos de autopsia.

Tras la apertura de la cavidad toraco-abdominal y la extracción visceral, se realizó disección en bloque del testículo con sus cubiertas, del epididímo y del cordón espermático, previa apertura del conducto inguinal.

Todo el bloque fue disecado, se ligó distalmente el cordón espermático y se inyectó a continuación, a través de la vena espermática, líquido de Bouin, sumergiendo el testículo también en dicho líquido durante cuarenta y ocho horas, al cabo de las cuales se obtuvo una sección sagital de 3 mm. de la cual se extrajo el exceso de fijador, tras pasos sucesivos por alcoholes de 50° y 70° , siendo a continuación incluida en parafina y procediendo a su corte y tinción.

Este material solamente fue usado para estudio óptico y no ultraestructural y se siguió la misma metodología que se ha descrito para el material de biopsia.

3.2.3. Metodología morfométrica.

Con toda la muestra, tanto la procedente del material de autopsia como del de biopsia y siguiendo a Nistal (96), se llevó a cabo la misma sistemática, de forma rigurosa(10). En las secciones teñidas con testosterona, según técnica P.A.P., realizamos el recuento celular, delimitando un campo de observación de $160.000 \mu^2$, usando oculares de 10 x, objetivo de 20 x y lupa correctora de 1,25 x; se procedió a contar, en cada caso y en cada lado, el número de células de Leydig existentes, en 10 campos de esas características, elegidos al azar, hallando posteriormente la cifra media por campo; así se calculaba el número de células de Leydig por unidad de área. Se contaron aquellas células teñidas con testosterona y que reunían alguna de las siguientes características (152):

- Células con abundante citoplasma y núcleo oval ó redondo, excéntrico y con membrana nuclear identificable.
- Células con un nucleolo al menos y gránulos citoplasmáticos.
- Células en las que el material granular deja un halo semilunar alrededor del núcleo ó junto a él.

A continuación, calculamos la densidad volumétrica de células de Leydig (Nv) según Mori y Christensen (83) y aplicamos la fórmula de Floderus (38): $Nv = Na (T + D - 2h)$, en la cual Na es el número de núcleos de células de Leydig por uni-

dad de área, T es el grosor del corte (6,3 micras), D es el diámetro medio de 10 núcleos de células de Leydig y h es la más pequeña membrana nuclear visible (10% del diámetro nuclear medio).

En el material procedente de autopsia, en el cual queríamos calcular el número total de células de Leydig por testículo, medimos en primer lugar el volumen testicular usando la fórmula de una elipsoide que ya usó Ahmad en 1.969 (3) en la que el volumen testicular (Vt) sería $Vt = 4/3\pi a b^2$ en la cual a corresponde al tamaño del semieje mayor del testículo medido en el corte histológico y b corresponde al semieje menor de dicho corte. A continuación, multiplicando $N_v \times V_t$ obteníamos el número total de células de Leydig pro testículo.

3.2.4. Métodos estadísticos.

Se hizo, en primer lugar la comparación de medias a través del análisis de la varianza y de la t de Student para datos pareados, previo cálculo de la media y del error de la media de los N_v , de todos los casos procedentes del material de biopsia, separando, en cada grupo, lado derecho y lado izquierdo, comparando posteriormente todos estos grupos en conjunto para ver si existían cifras significativamente diferentes entre sí y entre ambos lados. A continuación se hizo el

cálculo de la media y el error de los Nv de las biopsias de lado con Varicocele (20 izquierdos, 2 derechos y 16 bilaterales) y del lado sin Varicocele (20 izquierdos y 2 derechos), comparando ambos grupos entre sí.

El material de autopsia se agrupó de forma similar calculando la media y el error estandar de la media de los Nv de ambos lados, en los dos grupos de edad, con Varicocele izquierdo, comparando ambos lados y ambos grupos entre sí.

Se realizó un análisis de la varianza y de la t de Student para datos pareados con este material. A continuación se calculó la media y el error estandar de la media de los Nv del lado con Varicocele (5 izquierdos y 2 bilaterales) y del lado sin Varicocele (5 izquierdos), en ambos grupos de edad. Se compararon ambos bloques y ambos grupos de edad entre sí.

El mismo tipo de estudio estadístico que se había llevado a cabo con el número de células de Leydig por unidad de volumen testicular (Nv) se llevó a cabo con el número total de células de Leydig por testículo (Nt), en el material de autopsia, calculando la media y el error estandar de la media de los Nt del lado izquierdo y del lado derecho en aquellos Varicoceles del lado izquierdo y en ambos grupos de edad, realizando posteriormente también un análisis de la varianza y de la t de Student. También se obtuvo la media y el error estandar de la media de los Nt del lado con Varicocele (5 izquierdos y 2 bilaterales) y del lado sin Varicocele (5 izquierdos)

en ambos grupos de edad, comparando todos los resultados entre sí, por medio del análisis de la varianza para un factor (estudio en bloque).

Posteriormente se realizó un estudio comparativo del número de células de Leydig por unidad de volumen testicular, (Nv), de todos los grupos: lado con Varicocele y lado contralateral, del grupo de biopsias y de ambos grupos de autopsias, con el grupo control. Se hizo también el análisis de la varianza para un factor .

Por último, se realizó un estudio comparativo del número total de células de Leydig por testículo (Nt) del lado con Varicocele (5 izquierdos y 2 bilaterales) y del lado sin Varicocele (5 izquierdos), de ambos grupos de autopsia, con el grupo control. En aquellos casos en que hubo significación se aplicó el test de Student- Newman-Keuls, para ver qué grupo aportaba la significación y a qué nivel.

4.- RESULTADOS

4. RESULTADOS.

4.1. MATERIAL DE BIOPSIA

Todas las biopsias, independientemente del lado de afectación del Varicocele, mostraron las alteraciones que se han descrito cómo más características de este tipo de patología: en diez de los casos se observó hipoespermatogénesis moderada ó leve con desprendimiento de células inmaduras en la luz (Fig. 1); en tres casos, hipoespermatogénesis de grado más severo, con el mismo tipo de descamación; en otros tres se vió parada a nivel de espermátides y en dos, parada a nivel de espermaticitos de primer orden (Fig. 2); un patrón "en mosaico" se evidenció en los restantes. Las alteraciones eran bilaterales, de grado ligeramente menor en el lado contralateral y en los ~~dos~~ casos con patrón "en mosaico" en el lado del Varicocele, en el contralateral se observó una hipoespermatogénesis moderada. A nivel del intersticio había edema, un cierto grado de fibrosis y vasos venosos ectásicos, con esclerosis de su pared (Fig. 3). Las células de Leydig, bien delimitadas (Fig. 4), se encontraban aparentemente aumentadas en número, de forma difusa, alrededor de los vasos (Fig. 5). Con la tinción de P.A.P., para detectar testosterona intracitoplasmática se observaron, en color marrón oscuro, grumos en general gruesos (Fig. 6) pero que a veces adquirirían una apariencia más delicada (Fig. 7); sólo raramente algunos citoplasmas no se teñían. Realizado el estudio cuantitativo del número de células

de Leydig por unidad de volumen testicular (Nv), en aquellos pacientes con Varicocele izquierdo, vimos que los recuentos eran similares salvo, en el caso número 16, en el que coincidió con una hipoespermatogénesis severa. La media y el error estandar de la media, de los Nv de los veinte casos de Varicocele del lado izquierdo se exponen en la TABLA I. Aplicado a estos resultados el test de Student para datos pareados, no se vieron diferencias significativas entre ambos lados. La misma determinación se llevó a cabo en aquellos casos con Varicocele derecho y en aquellos con Varicocele bilateral, observándose que los contajes en el lado izquierdo y en el lado derecho no diferían sustancialmente de los anteriores, expresándose también las medias de estos casos en la TABLA II. Aplicado el test de Student para datos pareados, tampoco se observó significación entre ambos lados en aquellos casos con Varicocele derecho y entre ambos lados en aquellos casos con Varicocele bilateral.

Realizado el análisis de la varianza para un factor (estudio en bloque) de toda la muestra, Varicocele izquierdo, Varicocele derecho, y Varicocele bilateral, ambos lados, de los tres grupos, no encontramos tampoco diferencias significativas entre ellos, cómo se expresa en la TABLA III.

Comparados a su vez los Nv del lado que tenía el Varicocele (20 izquierdos, 2 derechos y 16 bilaterales) y del contralateral (20 izquierdos y 2 derechos) con el grupo control, no se observaron diferencias significativas (TABLA IV).

4.2. Material de autopsia.

Las alteraciones microscópicas evidenciadas en el grupo de menor edad, con Varicocele izquierdo fueron: un caso con imagen "en mosaico"; dos, con hipoespermatogénesis leve, un caso con hipoespermatogénesis severa (Fig. 7), viéndose espermátides anómalas (Fig. 8) y acompañados todos ellos de desprendimiento de células inmaduras en la luz, y uno con parada a nivel de espermátide. En el caso con Varicocele bilateral, se observó una hipoespermatogénesis leve. Las lesiones eran similares también, al igual que en las biopsias, en ambos testículos, de un grado ligeramente menor; en aquel caso en que se observó imagen "en mosaico", en el lado contralateral existió una hipoespermatogénesis moderada. A nivel del intersticio se vió moderado edema y aparente aumento del número de células de Leydig que mostraban un citoplasma bien delimitado (Fig. 9), no evidenciándose depósitos de lipofucsina y sí en algunas ocasiones llamativos cristales de Reinke.

En el grupo de pacientes de mayor edad y con Varicocele izquierdo, se observaron tres casos con imágenes "en mosaico" (Fig. 10 y Fig. 11), con áreas extensas que mostraban revestimiento tubular sólo por células de Sertoli (Fig. 12), un caso con hipoespermatogénesis severa (Fig. 13), otro con hipoespermatogénesis moderada (Fig. 14), siempre acompañados de descamación celular intratubular; en el caso con Varicocele bilateral se vió una hipoespermatogénesis leve. En los Varico-

celes izquierdos, las alteraciones en el testículo contralateral fueron similares, de grado ligeramente menor y en los casos de imagen "en mosaico" se observó una hipoespermatogénesis moderada. A nivel del intersticio había edema, venas de pared esclerosada y aparente aumento difuso de las células de Leydig. El depósito de testosterona intracitoplasmática fue de características similares a los casos de biopsia, en el grupo de menor edad, observándose en el de mayor edad, un mayor número de células teñidas con menos intensidad con la técnica de P.A.P.

Ultraestructuralmente, hemos encontrado las lesiones ya descritas por otros autores (17,43,104,129,143), como aumento del número de mitocondrias y disminución de vacuolas lipídicas en las células de Leydig, detectándose mayor alteración en el tubo seminífero a nivel del compartimento próximo a la luz, con pérdida del revestimiento de las células germinales por el citoplasma de las células de Sertoli.

El número de células de Leydig por unidad de volumen testicular (Nv) hallado en ambos grupos y en ambos lados, se expone en la TABLA V, así como la media y el error estandar de la media.

El estudio estadístico, por medio de test de Student para datos pareados, comparando el lado izquierdo y el lado derecho, en aquellos casos con Varicocele izquierdo y en ambos

grupos de edad, no mostró diferencias significativas. El estudio estadístico de la media del lado con Varicocele (5 izquierdos y 2 bilaterales), frente al lado sin Varicocele (5 izquierdos), a través del análisis de la varianza para un factor (estudio en bloque), de ambos grupos, no mostró diferencias significativas entre sí, ni con el grupo control (TABLA VI); tampoco se vió ninguna diferencia comparando estos grupos con los correspondientes procedentes del material de biopsia (TABLA VII). El resultado del cálculo del número total de células de Leydig por testículo (Nt), en cada grupo de edad y en cada lado, y las medias de cada muestra, se expone en la TABLA VIII.

Realizado el test de Student para datos pareados no se observaron diferencias significativas entre ambos lados (TABLA VIII). A continuación se calculó la media de los Nt del lado con Varicocele (5 izquierdos y 2 bilaterales) y del contralateral (5 izquierdos) y de ambos grupos de edad; comparados entre sí, tampoco se observaron diferencias significativas, cómo se ve en la TABLA IX.

Por último, los resultados procedentes de estas últimas muestras se compararon con el grupo control a través del análisis de la varianza para un factor y se encontraron diferencias altamente significativas ($p < 0,00001$) (TABLA X).

Aplicando el test de Student-Newman-Keuls vemos, en la

TABLA XI, que las diferencias las aporta el grupo control que es significativamente diferente a nivel de $p < 0,01$ del grupo de autopsias de 25 a 40 años, tanto en el lado con Varicocelo, como en el lado contralateral y del grupo de 61 a 70 años, en el lado contralateral; también presenta diferencia significativa a nivel de $p < 0,05$ frente al grupo de autopsias de 61 a 70 años, en el lado con Varicocelo.

T A B L A I

MATERIAL DE BIOPSIA

DETERMINACION DEL NUM. DE CELULAS DE LEYDIG POR
UNIDAD DE VOLUMEN TESTICULAR EN PACIENTES CON
VARICOCELE IZQUIERDO

CASOS	LOCALIZACION VARICOCELE	Nv	$\bar{X} \pm S\bar{X}$	t
Nº 1	IZQUIERDO	I:36,93 D: 26,83	I:43,96 [±] 3,02 D:48,39 [±] 4,64	N.S.
" 2		I:44,97 D: 49,73		
" 3		I:34,39 D: 29,98		
" 4		I:52,91 D: 47,61		
" 5		I:49,54 D: 52,02		
" 6		I:52,02 D: 45,29		
" 7		I:42,32 D:104,93		
" 8		I:37,03 D: 38,80		
" 9		I:33,74 D: 40,56		
" 10		I:41,44 D: 45,94		
" 11		I:43,51 D: 58		
" 12		I:47,61 D: 57,24		
" 13		I:54,67 D: 61,72		
" 14		I:34,39 D: 31,74		
" 15		I:30,86 D: 28,21		
" 16		I:90,82 D: 92,59		
" 17		I:30,63 D: 34,23		
" 18		I:42,93 D: 46,51		
" 19		I:37,91 D: 29,10		
" 20		I:40,54 D: 46,84		

$\bar{X} \pm S\bar{X}$ = Media [±] error estandar de la media.

Nv = Nº de células de Leydig por unidad de volumen testicular (X10⁶)

I = Lado Izquierdo.

D = Lado Derecho.

t = Test de Student para datos pareados.

N.S. = No significativo.

T A B L A I I

MATERIAL DE BIOPSIA

DETERMINACION DEL N° DE CELULAS DE LEYDIG

POR UNIDAD DE VOLUMEN TESTICULAR EN PACIENTES CON

VARICOCELE DERECHO Y BILATERAL

CASOS	LOCALIZACION VARICOCELE	Nv	$\bar{X} \pm S\bar{X}$	t
Nº 21	DERECHO	I: 43,20 D: 49,54	I: 49,07 \pm 8,30	N.S.
" 22		I: 54,95 D: 42,34	D: 45,94 \pm 5,09	
" 23	BILATERAL	I: 40,25 D: 35,27	I: 41,15 \pm 3,13 D: 43,73 \pm 5,12	N.S.
" 24		I: 35,13 D: 27,02		
" 25		I: 46,51 D: 54,95		
" 26		I: 44,40 D: 60,36		
" 27		I: 54,67 D: 61,27		
" 28		I: 30,86 D: 31,30		
" 29		I: 45,85 D: 35,52		
" 30		I: 31,53 D: 44,14		

$\bar{X} \pm S\bar{X}$ = Media \pm error estandar de la media.

Nv = N° de células de Leydig por unidad de volumen testicular ($\times 10^6$)

I = Lado Izquierdo.

D = Lado Derecho.

N.S. = No significativo.

T A B L A I I I

MATERIAL DE BIOPSIA

ANALISIS DE LA VARIANZA PARA UN FACTOR

(Estudio en bloque de todos los casos de biopsia)

TAMAÑO MUESTRA	LOCALIZACION VARICOCELE	Nv : $\bar{X} \pm S\bar{X}$	F
20	IZQUIERDO	I: 43,96 \pm 3,94 D: 48,39 \pm 4,64	N.S.
2	DERECHO	I: 49,07 \pm 8,30 D: 45,94 \pm 5,09	
8	BILATERAL	I: 41,15 \pm 3,13 D: 43,73 \pm 5,12	

 $\bar{X} \pm S\bar{X}$ = Media \pm error estandar de la media.Nv = N° de células de Leydig por unidad de volumen testicular ($\times 10^6$). Se expresa la Media \pm el error de la media.

F = Análisis de la varianza para un factor (estudio en bloque).

N.S. = No Significativo.

T A B L A I V

MATERIAL DE BIOPSIA
ESTUDIO COMPARATIVO DEL TESTICULO CON VARICOCELE Y EL
CONTRALATERAL, CON EL GRUPO CONTROL

	GRUPO CONTROL	TESTE CON VARICOCELE	TESTE CONTRALATERAL	F
TAMAÑO MUESTRA	40	38	22	N.S.
$\bar{X} \pm \sqrt{\frac{Nv}{N}} S\bar{X}$	48,28 \pm 0,35	43,43 \pm 1,93	48,46 \pm 4,11	

$\bar{X} \pm S\bar{X}$ = Media \pm error estandar de la media.

Nv = N° de células de Leydig por unidad de volumen testicular ($\times 10^6$)

F = Análisis de la varianza para un factor.

N.S. = No significativo.

T A B L A V

MATERIAL DE AUTOPSIA

DETERMINACION DEL N° DE CELULAS DE LEYDIG POR UNIDAD DE VOLUMEN TESTICULAR

CASOS	GRUPO DE EDAD	LOCALIZACION VARICOCELE	Nv	$\bar{X} \pm S\bar{X}$	t
1	25-40 años	IZQUIERDO	I: 43,50 D: 36,91	I: 57,92 \pm 12,83 D: 49,28 \pm 11,65	N.S.
2			I: 71,02 D: 70,56		
3			I: 81,13 D: 38,45		
4			I: 74,27 D: 77,20		
5			I: 19,81 D: 23,40		
6		BILATERAL	I: 41,11 D: 32,23	-	-
7	61-70 años	IZQUIERDO	I: 48,80 D: 56,82	I: 48,72 \pm 5,05 D: 49,30 \pm 3,59	N.S.
8			I: 56,31 D: 40,82		
9			I: 36,63 D: 45,60		
10			I: 41,11 D: 56,83		
11			I: 60,80 D: 46,51		
12		BILATERAL	I: 34,83 D: 53,62	-	-

$\bar{X} \pm S\bar{X}$ = Media \pm error estandar de la media.

Nv = N° de células de Leydig por unidad de volumen testicular ($\times 10^6$).

I = Lado Izquierdo.

D = Lado Derecho.

t = Test de Student para datos pareados.

N.S. = No significativo.

T A B L A V I

MATERIAL DE AUTOPSIA

ESTUDIO COMPARATIVO DEL N° DE CELULAS DE LEYDIG POR UNIDAD DE VOLUMEN TESTICULAR, DE AMBOS GRUPOS DE AUTOPSIA, TESTICULO CON VARICOCELE Y CONTRALATERAL, CON EL GRUPO CONTROL

	GRUPO CONTROL	TESTE CON VARICOCELE (25-40 años)	TESTE CONTRALATERAL (25-40 años)	TESTE CON VARICOCELE (61-70 años)	TESTE CONTRALATERAL (61-70 años)	F
TAMAÑO MUESTRA	40	7	5	7	5	N.S
Nv ($\bar{X} \pm S\bar{X}$)	48,24 \pm 0,35	51,84 \pm 9,63	49,28 \pm 11,60	47,23 \pm 4,14	49,30 \pm 3,59	

$\bar{X} \pm S\bar{X}$ = Media \pm error estandar de la media.

Nv = N° de células de Leydig por unidad de volumen testicular ($\times 10^6$)

F = Análisis de la varianza para un factor.

N.S. = No significativo.

T A B L A V I I

ESTUDIO COMPARATIVO DEL N° DE CELULAS DE LEYDIG POR UNIDAD DE
VOLUMEN TESTICULAR DE TODOS LOS GRUPOS, CON EL GRUPO CONTROL

	GRUPO CONTROL	BIOPSIAS TESTE CON VARICOCELE	BIOPSIAS TESTE CONTRALATERAL	AUTOPSIAS TESTE CON VARICOCELE (25-40 años)	AUTOPSIAS TESTE CONTRALATERAL (25-40 años)	AUTOPSIAS TESTE CON VARICOCELE (61-70 años)	AUTOPSIAS TESTE CONTRALATERAL (61-70 años)	F
TAMAÑO MUESTRA	40	38	22	7	5	7	5	N.S.
$\bar{X} \pm S\bar{X}$ (N_v)	48,24 \pm 0,35	43,43 \pm 1,93	48,46 \pm 4,11	51,84 \pm 9,63	49,28 \pm 11,60	47,23 \pm 4,14	49,30 \pm 3,59	

$\bar{X} \pm S\bar{X}$ = Media \pm error estandar de la media.

N_v = N° de células de Leydig por unidad de volumen testicular ($\times 10^6$)

F = Análisis de la varianza para un factor (estudio en bloque).

N.S. = No significativo.

T A B L A VIII

MATERIAL DE AUTOPSIA

DETERMINACION DEL N° TOTAL DE CELULAS DE LEYDIG POR TESTICULO

CASOS	GRUPO DE EDAD	LOCALIZACION VARICOCELE	N_T	$\bar{X} \pm S\bar{X}$	t
1	25-40 años	IZQUIERDO	I: 1.344,15 D: 985,23	I: 1.512,30 ⁺ 339,27 D: 1.348,95 ⁺ 386,96	N.S.
2			I: 1.588,98 D: 2.002,20		
3			I: 1.961,80 D: 925,82		
4			I: 2.211,16 D: 2.323,72		
5			I: 455,40 D: 507,78		
6	61-70 años	BILATERAL	I: 1.233,15 D: 966,18	-	-
7		IZQUIERDO	I: 1.073,60 D: 1.283,68	I: 1.266,25 ⁺ 70,25 D: 1.366,38 ⁺ 112,20	N.S.
8			I: 1.374,28 D: 1.109,76		
9			I: 1.134,61 D: 1.322,42		
10			I: 1.138,05 D: 1.721,04		
11			I: 1.360,70 D: 1.395,11		
12		BILATERAL	I: 495,55 D: 1.372,16	-	-

N_T = N° total de células de Leydig por testículo ($\times 10^6$).

I = Lado Izquierdo

D = Lado Derecho

t = Test de Student para datos pareados.

$\bar{X} \pm S\bar{X}$ = Media \pm error estandar de la media.

T A B L A IX

MATERIAL DE AUTOPSIA

ESTUDIO COMPARATIVO DEL N° DE CELULAS DE LEYDIG POR TESTICULO
DE AMBOS GRUPOS, TESTICULO CON VARICOCELE Y CONTRALATERAL

	TESTE CON VARICOCELE (25-40 años)	TESTE CONTRALATERAL (25-40 años)	TESTE CON VARICOCELE (61-70 años)	TESTE CONTRALATERAL (61-70 años)	F
TAMAÑO MUESTRA	7	5	7	5	N.S.
N_T $(\bar{X} \pm S\bar{X})$	1394,36 \pm 243,65	1348,95 \pm 386,96	1135,56 \pm 127,10	1366,38 \pm 112,15	

$\bar{X} \pm S\bar{X}$ = Media \pm error estandar de la media.

N_T = N° de células de Leydig por testículo ($\times 10^6$)

F = Análisis de la varianza para un factor.

N.S. = No significativo.

T A B L A X

MATERIAL DE AUTOPSIA

ESTUDIO COMPARATIVO DEL N° TOTAL DE CELULAS DE LEYDIG POR TESTICULO,
AMBOS LADOS Y AMBOS GRUPOS, CON EL GRUPO CONTROL

	GRUPO CONTROL	TESTE CON VARICOCELE (25-40 años)	TESTE CONTRALATERAL (25-40 años)	TESTE CON VARICOCELE (61-70 años)	TESTE CONTRALATERAL (61-70 años)	p
TAMAÑO MUESTRA	40	7	5	7	5	-
N_T ($\bar{X} \pm S\bar{X}$)	$786 \pm 5,76$	$1394,36 \pm 243,65$	$1348,95 \pm 386,96$	$1135,56 \pm 127,10$	$1366,38 \pm 112,15$	$<0,00001$

$\bar{X} \pm S\bar{X}$ = Media \pm error estandar de la media.

N_T = N° total de células de Leydig por testículo ($\times 10^6$).

T A B L A X I

MATERIAL DE AUTOPSIA

ESTUDIO COMPARATIVO DEL N° TOTAL DE CELULAS DE LEYDIG POR TESTICULO, AMBOS LADOS Y AMBOS GRUPOS, CON EL GRUPO CONTROL (TEST DE STUDENT-NEWMAN-KEULS).

	1	2	3	4	5
1					
2	<0,01				
3	<0,01				
4	<0,05				
5	<0,01				

1.- Grupo Control, N_T .

2.- Teste con Varicocele, 25-40 años, N_T .

3.- Teste contralateral, 25-40 años, N_T .

4.- Teste con Varicocele, 61-70 años, N_T .

5.- Teste Contralateral, 61-70 años, N_T .

N_T .- N° total de células de Leydig por testículo.

Fig. 1.- Tubos seminíferos con hipoespermatogénesis moderada y parcial desprendimiento de células inmaduras en la luz (H.E., Neg x 63)

Fig. 2.- Parada de la maduración a nivel de espermatocitos de primer orden, con descamación celular intraluminal. Marcado edema intersticial (H.E., Neg x 63)

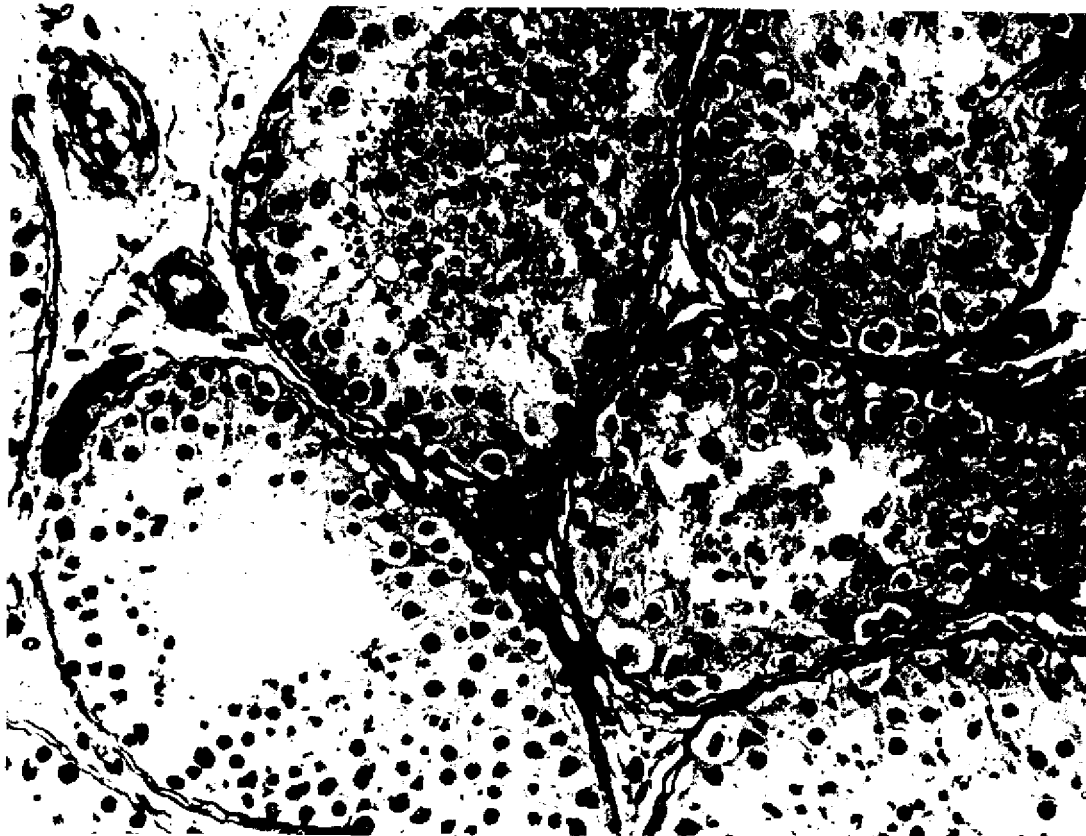


Fig. 1

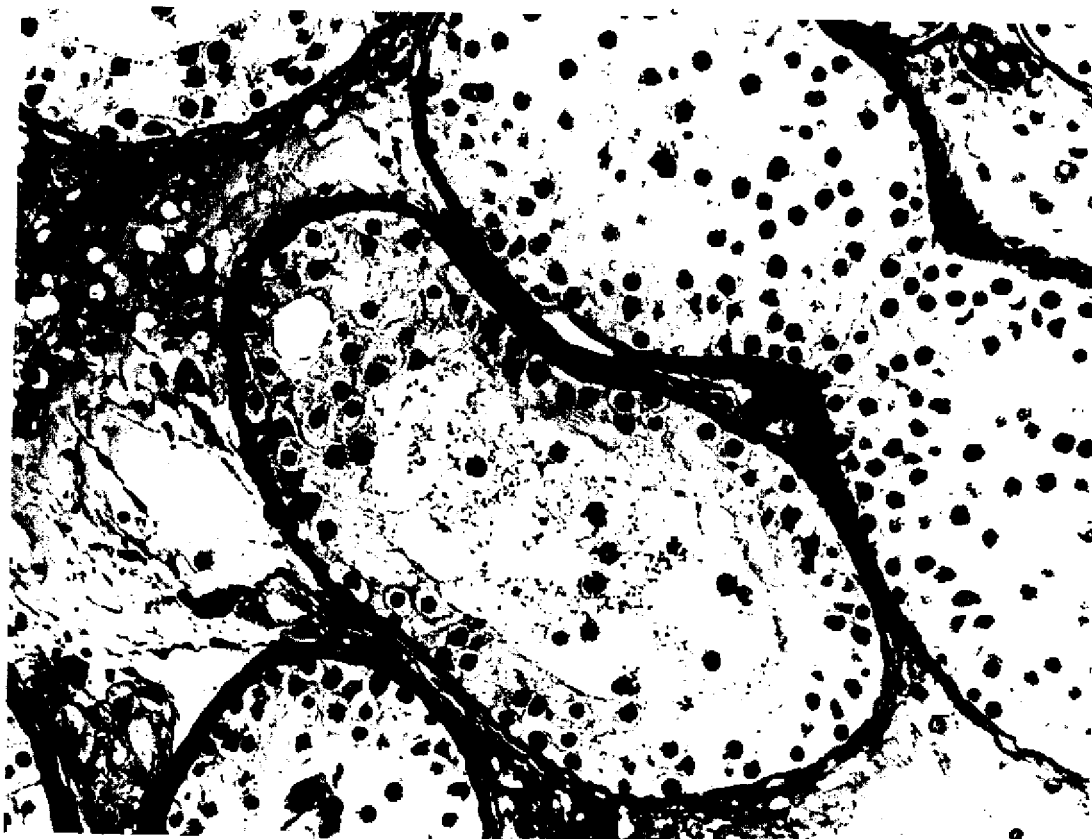


Fig. 2

Fig. 3.- Vasos ectásicos y de pared esclerosa, en un
tejido testicular con hiperplasia de células
de Leydig. (H.E., Neg x 63)

Fig. 4.- Acúmulo de células de Leydig, en vecindad de
un vaso. Intersticio edematoso. (H.E., Neg x 160)

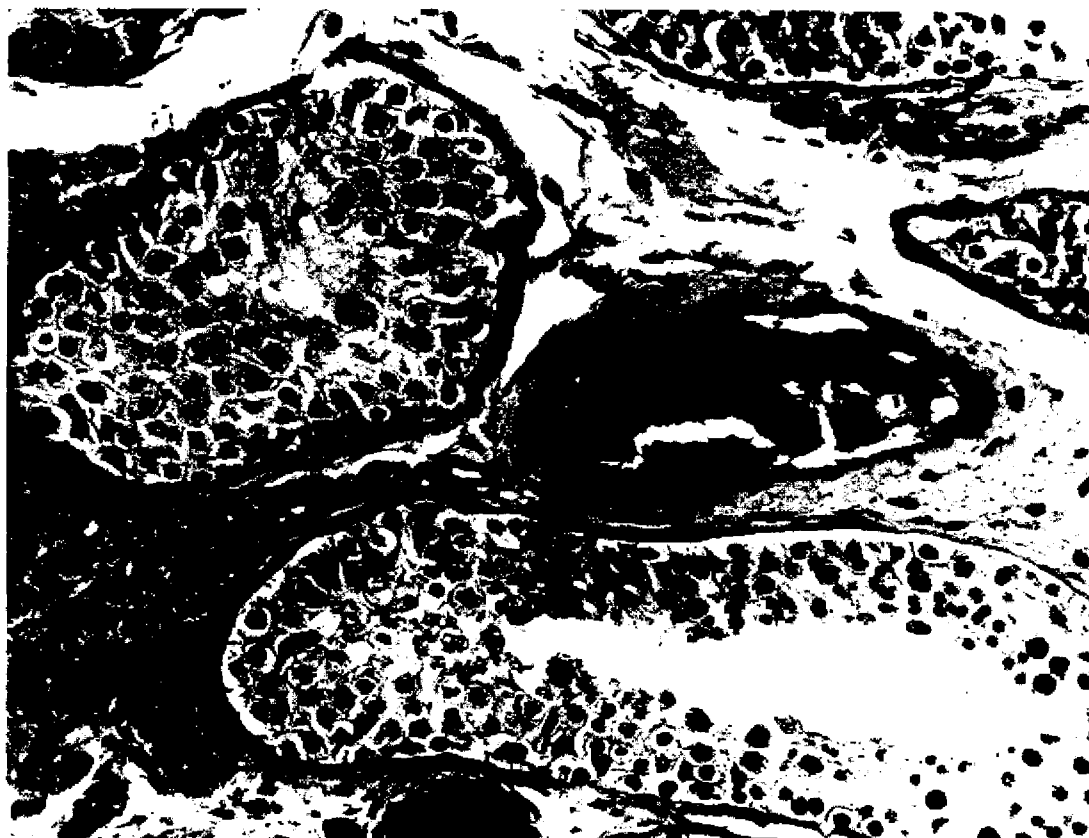


Fig. 3

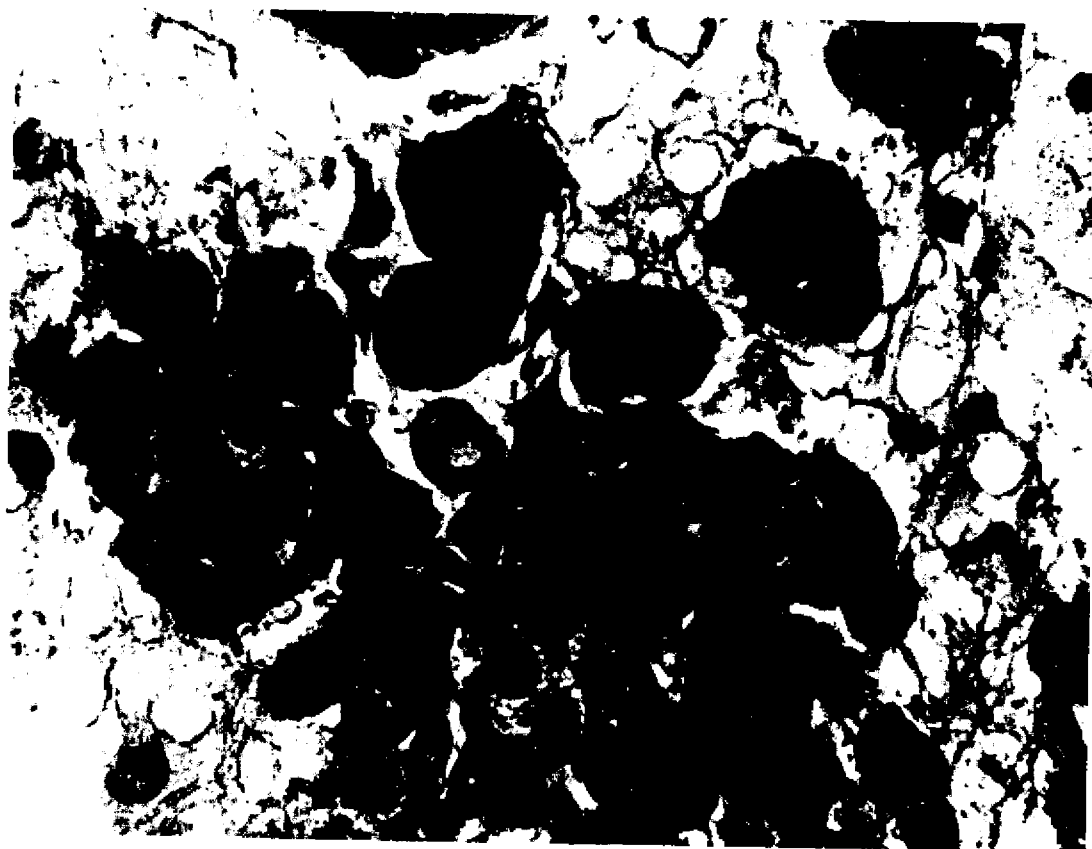


Fig. 4

Fig. 5.- Células de Leydig en las que se observan grupos gruesos de testosterona intracitoplasmática. (P.A.P. Testosterona, Neg. x 160).

Fig. 6.- Acúmulos de células de Leydig con testosterona intracitoplasmática dispuesta en grumos gruesos y en otros más finos. Tubos seminíferos con severa hipoespermatoogénesis. (P.A.P. Testosterona, Neg x 63).

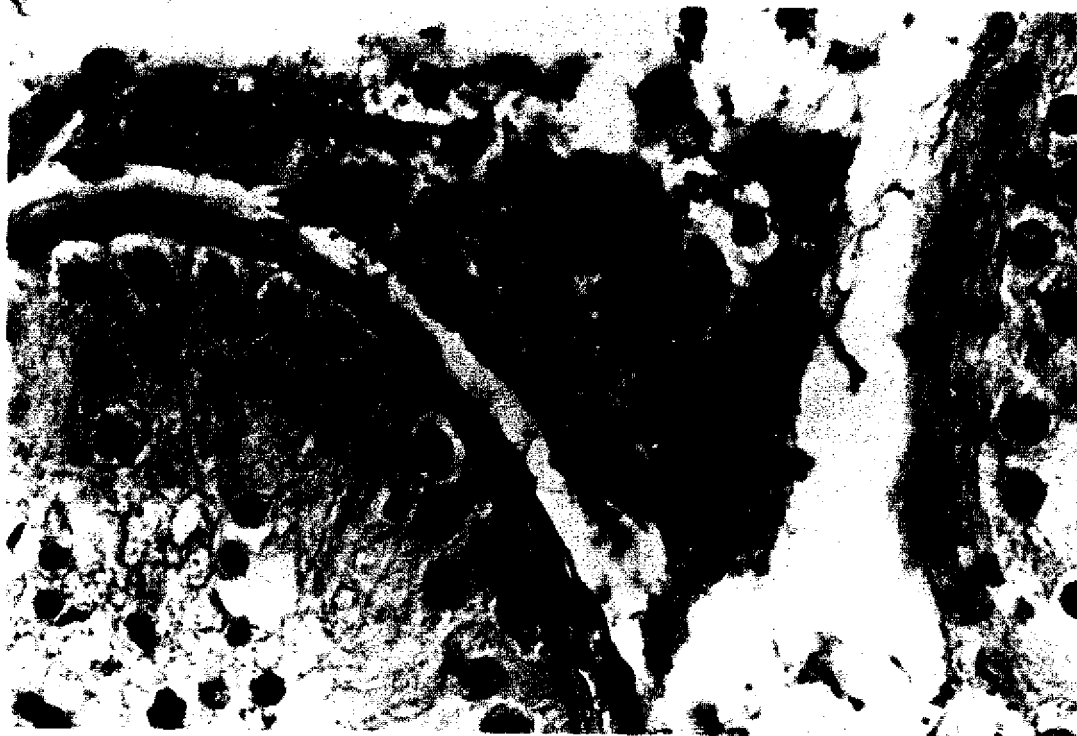


Fig. 5

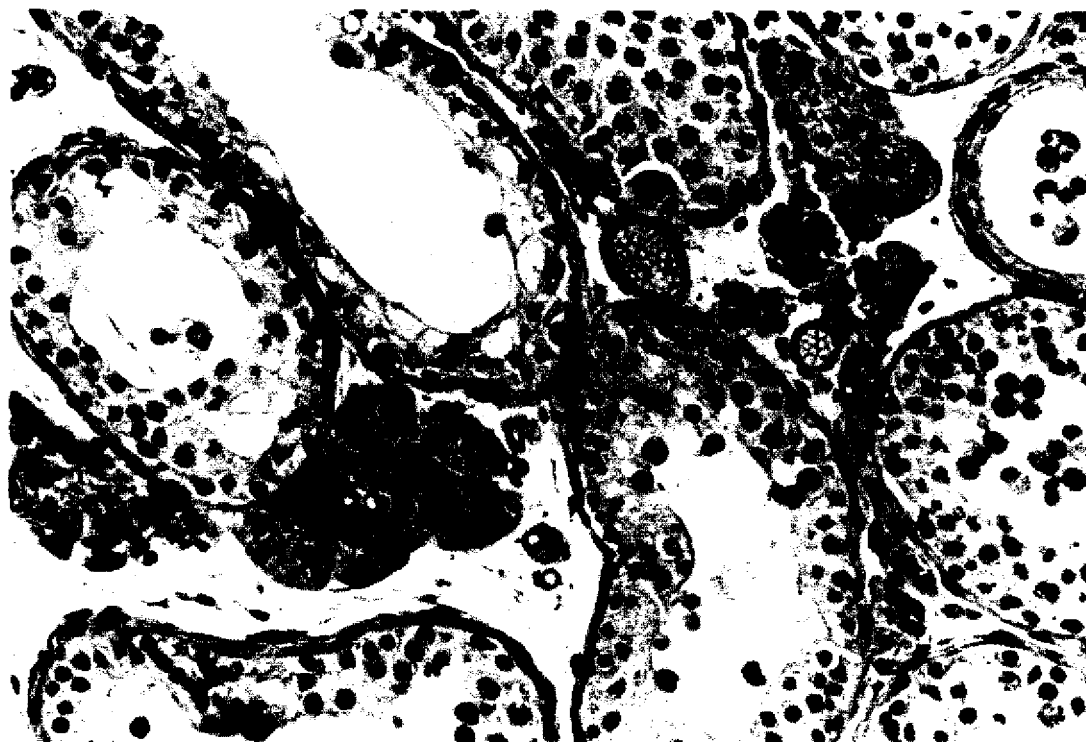


Fig. 6

Fig. 7.- Hipoespermatogénesis severa, con desprendimiento de células inmaduras en la luz tubular. (H.E., Neg x 63)

Fig. 8.- Detalle de un tubo seminífero con hipoespermatogénesis y formas anómalas de espermátides. (H.E., Neg x 160)



Fig. 7

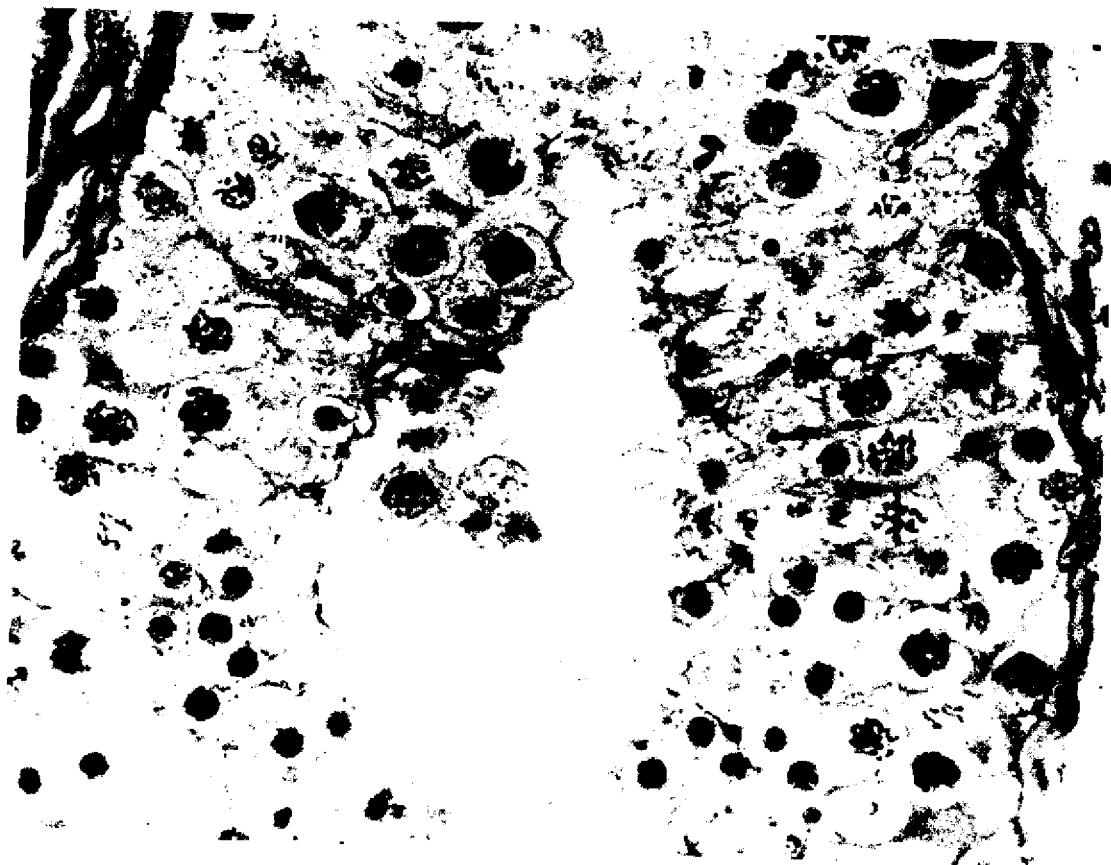


Fig. 8

Fig. 9.- Células de Leydig, con buena delimitación citoplasmática, y nucleolo prominente.

(H.E., Neg x 400)

Fig. 10.- Tubos seminíferos con hipoespermatogénesis severa, junto a otros, atróficos y parcialmente destruidos, repletos de espermatozoides. Reacción inflamatoria intersticial.

(H.E., Neg x 63)

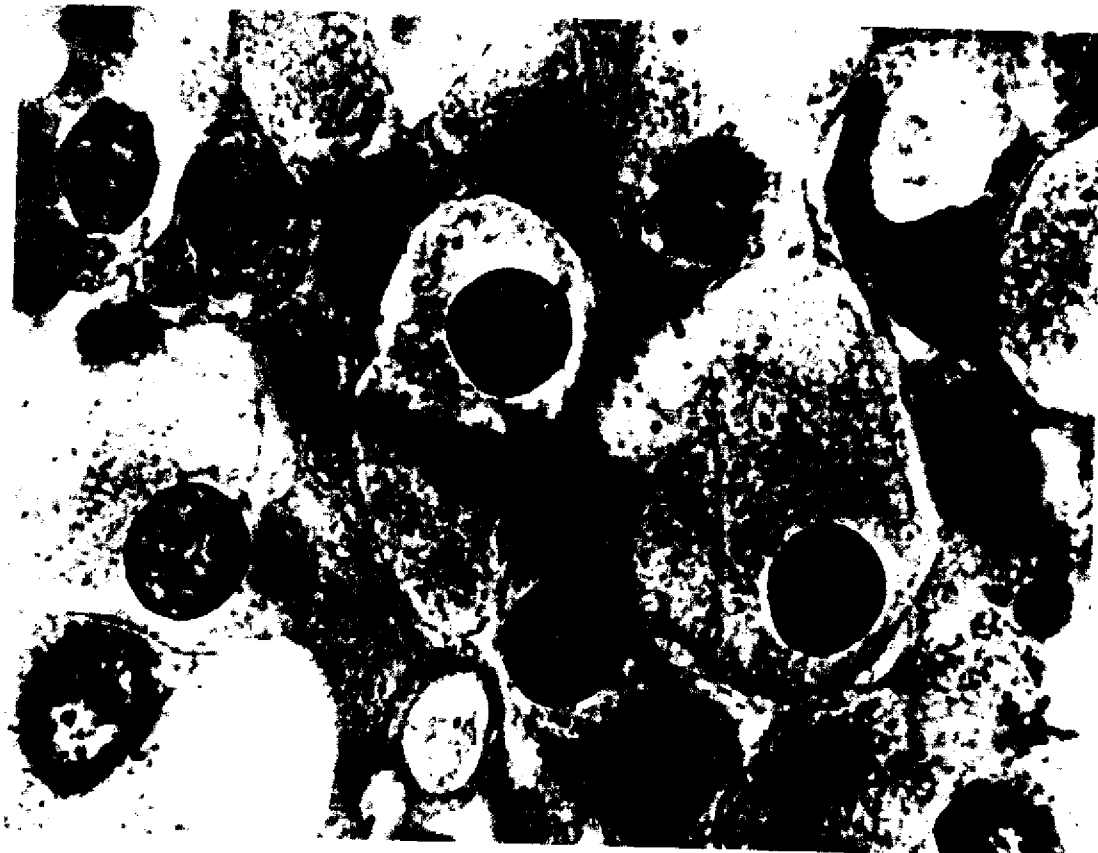


Fig. 9

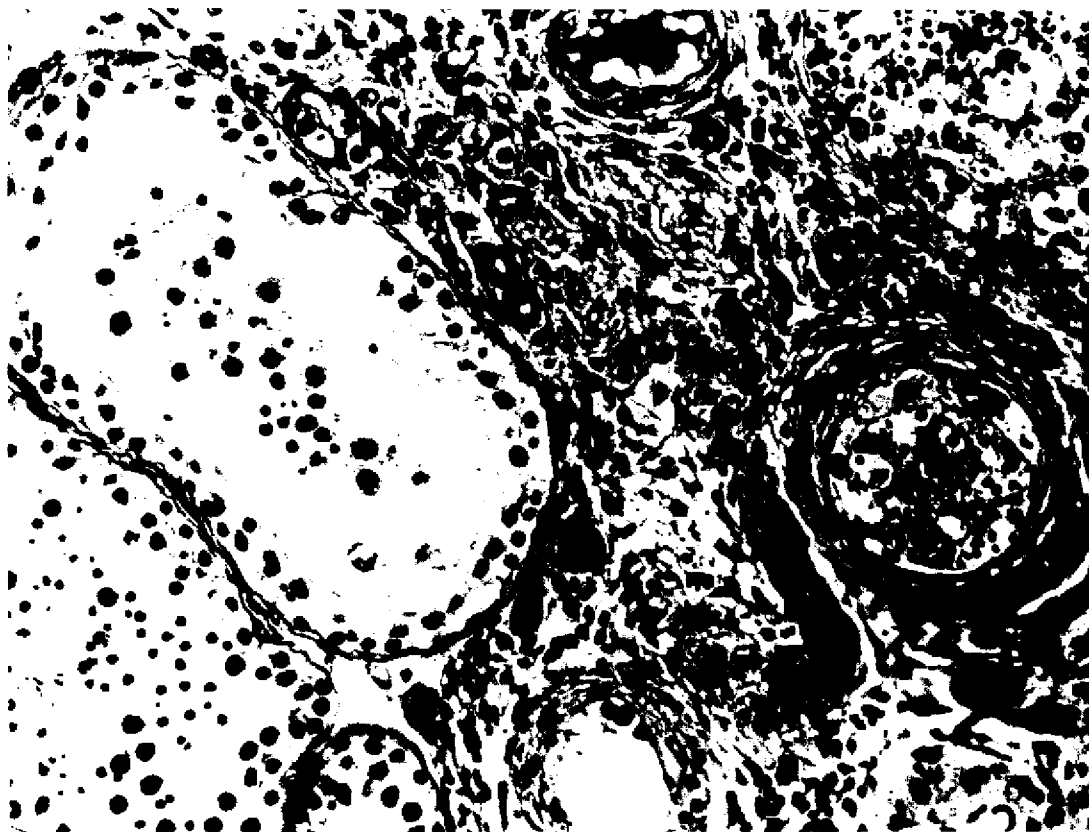


Fig. 10

Fig. 11.- Imágen "en mosaico": junto a tubos con espermatogénesis completa, se observan otros revestidos sólo por células de Sertoli. Intersticio edematoso con marcada hiperplasia de células de Leydig. (H.E., Neg x 63)

Fig. 12.- Zona revestida sólo por células de Sertoli, con vacuolización de su citoplasma.
(H.E., Neg x 63)

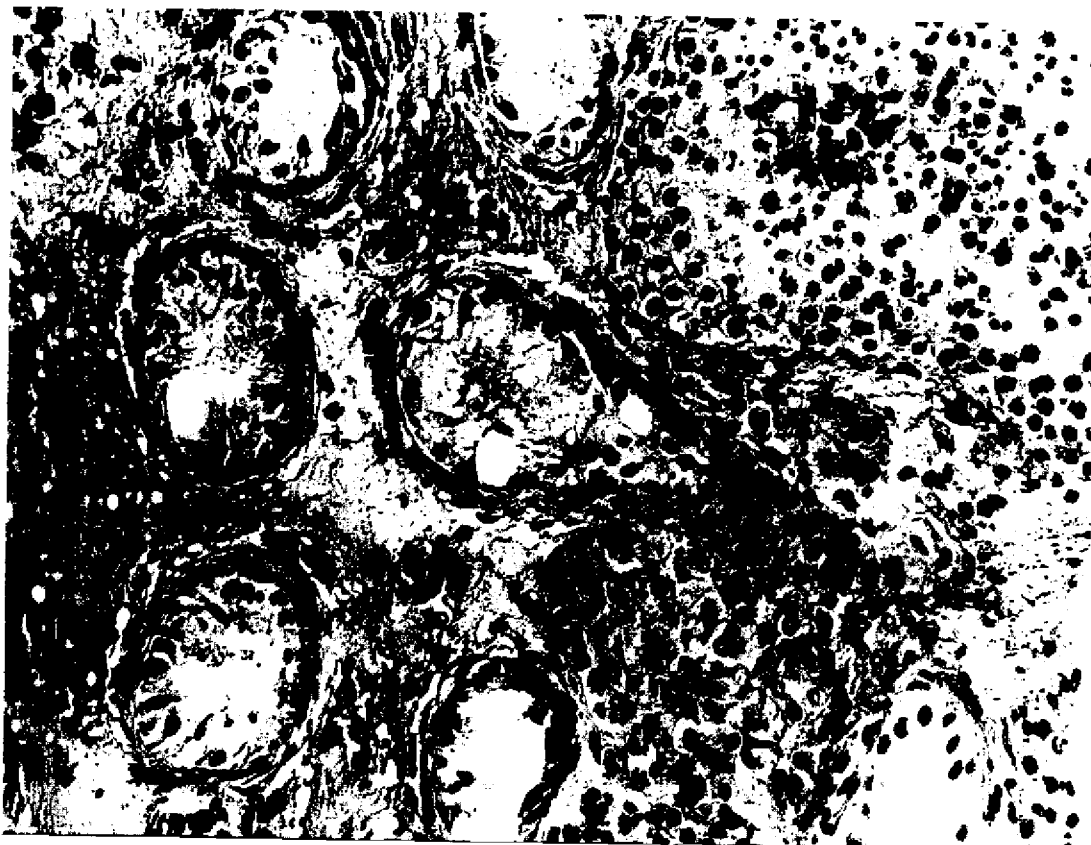


Fig. 11

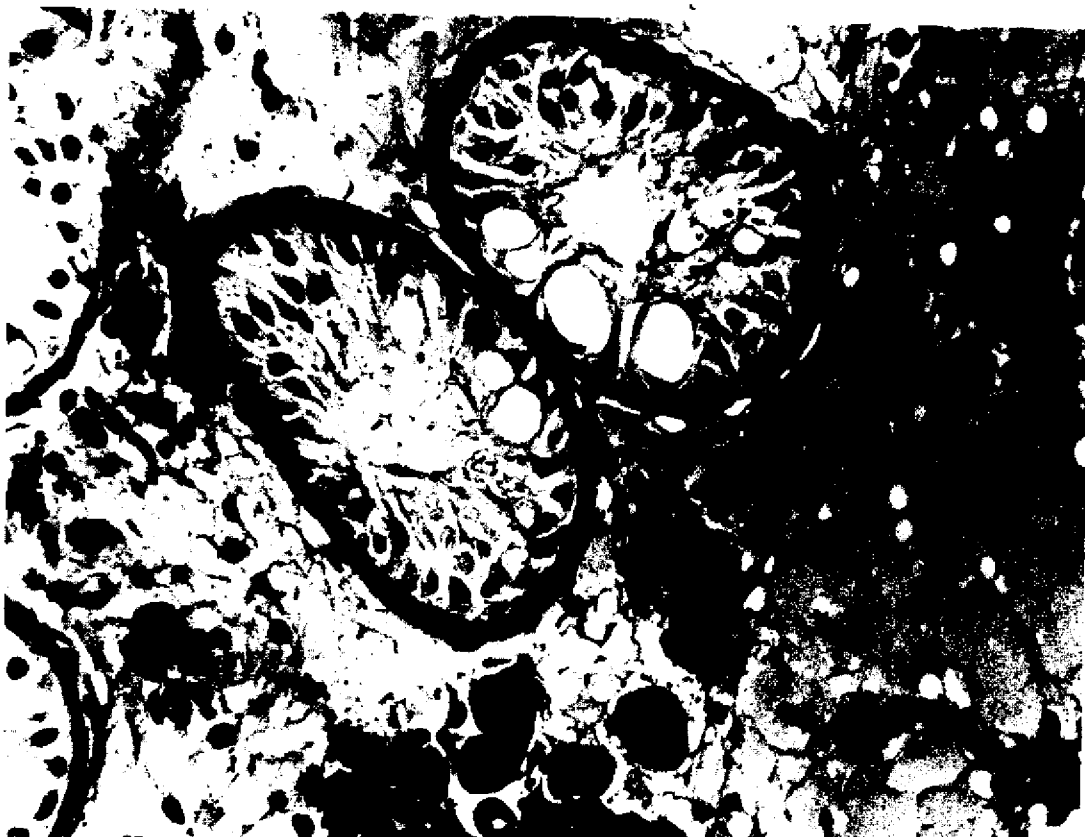


Fig. 12

Fig. 13.- Hipoespermatoogénesis severa, con desprendimiento de células inmaduras en la luz tubular. Edema intersticial intenso. (H.E., Neg x 63)

Fig. 14.- Hipoespermatoogénesis moderada. Edema intersticial y angiectasias; se ven algunos cristales de Reinke en las células de Leydig. (H.E., Neg x 63)

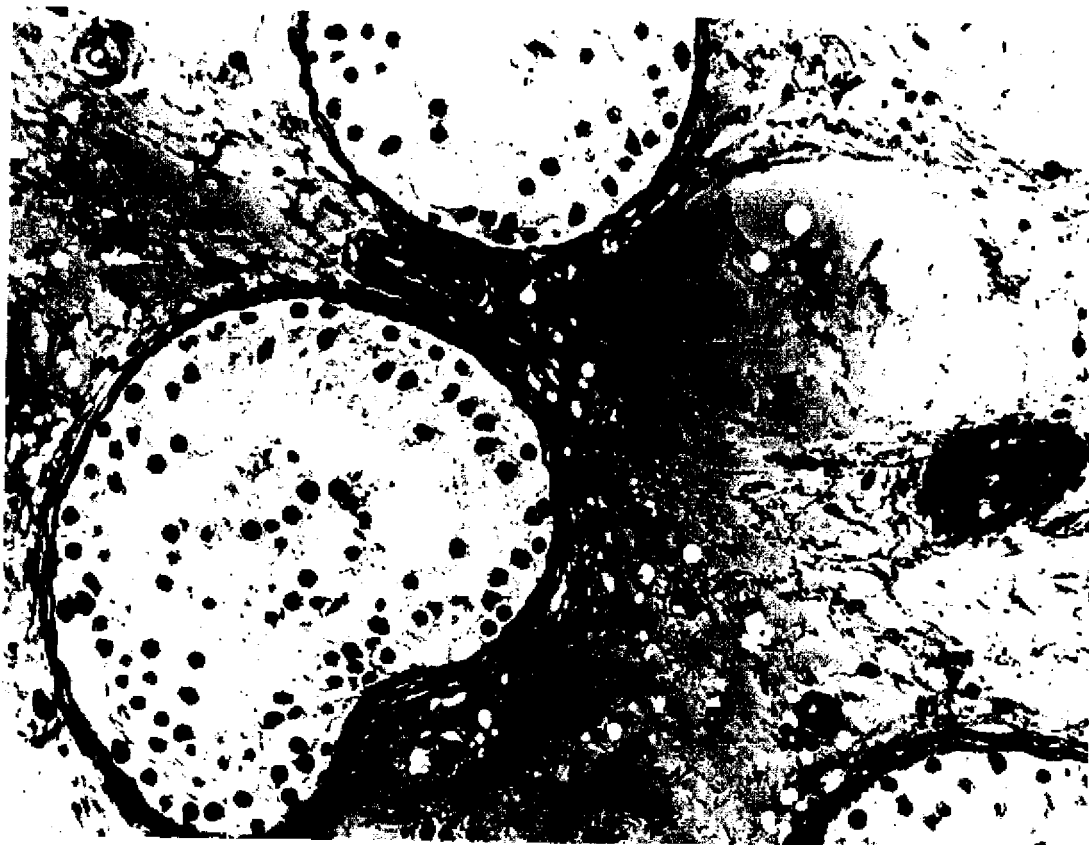


Fig. 13

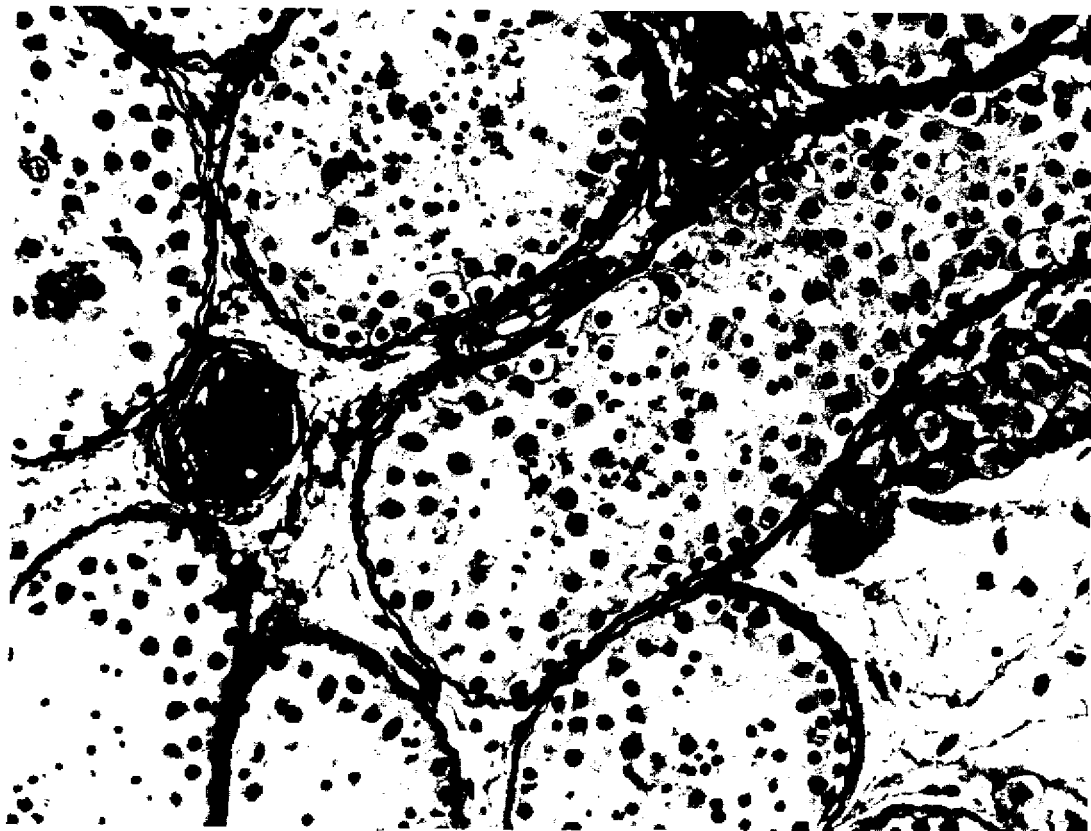


Fig. 14

5.- DISCUSSION

5. DISCUSION.

Desde que Leydig descubre, en 1.850 (72), unas células en el intersticio del testículo de muchos mamíferos, mostrando como, mientras en unas especies eran muy abundantes, en otras eran más escasas, señalando su abundancia en el cerdo y en el caballo donde llegaban a dar al testículo un aspecto achocolatado, por el pigmento que contenían, hasta nuestros días, estas células, han sido objeto de abundante número de trabajos de investigación. Sus características morfológicas, su localización intra y extragonadal y su función endocrina han sido tratadas en múltiples publicaciones (29,30,37,39,50,90,92,98,-,102,109). Ya en el año 1.903, Bouin y Ancel (14), las consideraron, en conjunto, un órgano endocrino con relativa independencia del resto de los elementos testiculares.

El concepto actual de la función de la célula de Leydig es mucho más preciso que entonces, y por otro lado mucho más amplio, puesto que parece evidente que, además de la testosterona, sintetiza otros productos bioactivos fundamentales para la regulación paracrina y autocrina de la función testicular y que es la principal fuente de estrógenos testiculares tras la madurez sexual. Además, dadas las interconexiones existentes entre ella y la célula de Sertoli, a través de la célula mioide del tubo seminífero, parece ser que la acción de la regulación de la microcirculación testicular por los pépti-

dos análogos de la LH-RH, producidos posiblemente por la célula de Sertoli, se realiza a través de la célula de Leydig (125).

No hay duda de la importancia en la regulación de la espermatogénesis, ya que destacan claramente aumentadas en número y volumen, durante los estadios VII y VIII de dicha espermatogénesis, en el ratón, momento en que es más necesaria la testosterona.

El término Varicocele, empleado por primera vez por Pott en el siglo XVIII, se define actualmente como una varicosidad del plexo pampiniforme (156). Previamente, Ambrosio Paré, en el siglo XVI, empleó otro término "circoccele" para denominarlo, que definió como "plexo vascular lleno de sangre malancólica" (74).

La referencia más antigua, no obstante, a esta afección es la de Amelius Cornelius Celsus (42 a.C. a 37 d.C.) (115), quien estableció que los griegos habían descrito originalmente Varicoceles y observó que "las venas se hinchaban y se retorcían por encima del testículo, que se volvía más pequeño que su compañero".

Las alteraciones a nivel del tubo seminífero, que se ven en el Varicocele, se han descrito con profusión de datos (48,62,71,85,107,108). Nosotros hemos encontrado, en el pre-

sente trabajo, hipoespermatogénesis, parada de la maduración, desprendimiento de células inmaduras en la luz tubular e imagen "en mosaico", predominando este último patrón en los pacientes de mayor edad, coincidiendo con la apreciación de otros autores (115).

La afectación de ambos lados ha sido similar, de grado ligeramente menor, hecho aceptado generalmente en la literatura (2,22,36,41,71,94,130), excepto en los casos en que hemos visto un patrón "en mosaico", ya que en estos casos la lesión se supone debido a un mecanismo de tipo local, obstructivo (93,95,115), presente en los Varicoceles axiales.

La esclerosis peritubular ha sido poco manifiesta en general, salvo en los grupos atróficos de los patrones "en mosaico", o en aquellos casos con hipoespermatogénesis marcada, sobre todo en el grupo de autopsias de mayor edad; las células míoideas eran poco prominentes en los cortes histológicos.

A nivel del intersticio, en todos los casos, vimos una aparente hiperplasia de las células de Leydig, de forma difusa, destacando también un marcado edema y un número aumentado de mastocitos.

Estas alteraciones a nivel del espacio intersticial creemos que tienen considerable importancia, puesto que a tra-

vés de él tiene lugar la conexión entre los productos de la célula de Sertoli y la de Leydig, y la de ésta con las células mioideas y los vasos (125).

La vascularización también se observaba alterada en todos los casos, viéndose venas esclerosas y vasos ectásicos; creemos que también a este nivel se encuentra una dificultad en el paso de las sustancias existentes en la sangre, dadas las características de estas paredes vasculares, dificultad que se ve agravada por el edema intersticial e incluso por la fibrosis que llega a observarse, por lo que las diferentes hormonas y metabolismos tendrían dificultad par llegar a su lugar de destino.

Estas alteraciones locales son las que creemos influyen, definitivamente, en que exista una hiperplasia de células de Leydig, que intentaría ser compensadora, por la dilución existente de sus productos en el "líquido intersticial".

Estos hallazgos a nivel intersticial han resultado los más controvertidos (16,22,32,36,55,62,110); además, dada la importancia que parece que tiene este intersticio, tanto el factor líquido intersticial como la propia célula de Leydig, en la regulación paracrina del testículo, ha resultado, en este momento, muy atractivo realizar una investigación centrada en la célula de Leydig.

También se encuentran en la actualidad algunos trabajos sobre los macrófagos, y los mastocitos en relación con esta patología ya que con frecuencia, en las biopsias con Varicocele, estos aparecen, aumentados en número (75); acerca de la función que desempeñan los macrófagos existen múltiples teorías (140), puesto que se ha visto que son esteroidogénicos y que poseen los mismos antígenos de superficie que la célula de Leydig.

La relación entre la célula de Leydig y el Varicocele ya se estableció en el año 1.967 (36,63); desde entonces han sido múltiples las publicaciones en las que se citaba una alteración en el número de células de Leydig, existiendo posturas contrapuestas; unos hablaban de disminución (32,52,56), otros de cifras normales (9,22,62,158), y otros de hiperplasia (16,32,33,36,110), siendo esta última teoría la más aceptada, aunque algunos la relacionaban con la existencia de otras áreas "hipoplásicas", encontrando ambos patrones asociados (32,46,94,147); ó bien hablaban de un aumento sólo ligero, en algunos casos, junto a otros dentro de la normalidad (62). En general, desde el punto de vista histológico, se ha aceptado que existía Hiperplasia de un determinado grupo celular cuando en un corte histológico, las células que lo componían, resultaban prominentes (6,132).

La existencia de una alteración en el número de células de Leydig en el Varicocele ya llamó la atención a Ibrahim

en 1.967 (63), aunque, para él, se trataba de una hiperplasia relativa, no real; todos los trabajos de esa época, hasta 1.978 (152), relacionados con la célula de Leydig, son únicamente observaciones subjetivas, sin estudios cuantitativos (32,33,36).

En 1.945, Sargent y Mc. Donald (120) hicieron los primeros intentos de cuantificar en el hombre normal las células de Leydig. Relacionaron el número de células de Leydig con el número de tubos seminíferos, en áreas arbitrarias de biopsia; llama la atención que no tuvieron en cuenta los cambios en el tamaño de los tubos seminíferos; con lo que la validez de los resultados sería cuestionable. En un intento de establecer la relación entre tubos seminíferos y células de Leydig, Dyckes en 1.969 (34), y usando un método cuantitativo, similar al empleado ya en otras áreas de la patología, como pulmón y hueso, establecieron la relación entre superficie ocupada por tubos seminíferos y por células de Leydig, en 22 testículos sin patología y en 72 con patología diversa en la que no se incluía específicamente ningún caso con Varicocele y en la que medía la superficie ocupada por los tubos seminíferos y por las células de Leydig en áreas elegidas al azar y sin realizar ningún tipo de recuento; usaba para calcular el volumen testicular, la longitud del testículo únicamente, lo cual es incorrecto, dada su forma y calculaba, de esta manera, el porcentaje de volumen ocupado por las células de Leydig; resulta, pues, un método no válido y en el que no tendrían cabida las

lesiones focales del Varicocele además de que no se tiene tampoco en cuenta los posibles cambios tubulares en otros tipos de patología.

Acercándonos al problema abordado en esta TESIS, encontramos un paso más en el trabajo de Agger y Johnsen, en 1.978 (2); ellos realizaron una "cuantificación grosera" en 39 pacientes con Varicocele que fueron posteriormente operados, valorando de uno a seis la posible hiperplasia de células de Leydig existente y considerando que tres, era el parámetro indicador de normalidad; estos autores encontraron, en el 39% de los pacientes, una hiperplasia moderada, en el 57% una cifra normal, y en el 4% un número disminuido. Los mismos autores y el mismo año publicaron otro artículo en el que hablaban de la bilateralidad de las lesiones ante Varicoceles unilaterales y, llevando a cabo el mismo tipo de recuento, observaron que las lesiones eran reversibles ya que en dieciseis de veintinueve pacientes con Varicocele, la hiperplasia se redujo a diez, tras la Varicocelectomía.

Weiss, en 1.978 (152), calculó, en dieciseis pacientes con Varicocele:

- a) el número de células de Leydig por tubo,
- b) el número de acúmulos (dos o más células contiguas), de células de Leydig, por tubo,

c) el número de células por acúmulo,

realizando un recuento de cada uno de estos elementos, en áreas preestablecidas y elegidas al azar concluyendo que, en su opinión, la mejor determinación cuantitativa es la del número de acúmulos de células de Leydig por tubo, opinión compartida posteriormente por Yoshida (158); por otro lado, en ese trabajo, no encontró correlación entre el grado de Varicocèle, la lateralidad, la edad, el volumen testicular y las lesiones que aparecían. Este trabajo es el primero de cuantificación de las células de Leydig en el Varicocèle.

Dado que el número de células de Sertoli no resultaría alterado por drogas, hormonas o irradiación y que podría considerarse como una constante, Heller (51) utilizó un método cuantitativo consistente en el cálculo del índice de células de Leydig/Sertoli que estimó sería representativo del número de células de Leydig, en cualquier biopsia testicular; para ello cuantificó las células de Leydig y de Sertoli en diecinueve hombres sanos y observó que no había variación significativa entre las distintas biopsias tomadas en diferentes tiempo, en el mismo sujeto y en el mismo lado.

Este método no tiene en cuenta las diferencias que pueden existir en determinados tipos de patología, en el diámetro de los tubos seminíferos, en los que consecuentemente está alterado el índice de células de Sertoli por tubo seminífero.

Trabajos de cuantificación por unidad de superficie no se encuentran hasta 1.985, en que Sirvent (131), siguiendo el mismo método que Pesce (105), consistente en contar el número de células de Leydig existentes en diez campos elegidos al azar, en cinco secciones, también al azar, en material de biopsia de pacientes con Varicocele, encontró un aumento significativo de estas células y vio que este aumento era absoluto, ya que no existía relación entre el número de células de Leydig y el diámetro tubular. Aunque este hallazgo es interesante, a esta hiperplasia observada, para que tenga un valor definitivo, le faltaría el cálculo por volumen testicular.

Ya en 1.969 se había hablado de la necesidad de realizar estudios volumétricos (4,34) en testículos, para valorar, objetivamente, cualquier trabajo basado en recuentos celulares en el testículo; un método que parece más preciso que el de usar sólo un diámetro testicular (34) es el de aplicar la fórmula de Floderus (38), considerando al testículo como una elipsoide en la que los semiejes a y b son medidos en el corte histológico, siendo el volumen testicular: $V_t = 4\pi ab^2/3$, en la que el semieje mayor sería a y el semieje menor sería b , fórmula que se ha utilizado en diferentes trabajos de patología testicular en la bibliografía (83,96).

Como hemos visto, no existe un estudio de cuantificación del número de células de Leydig referido a volumen testicular en el Varicocele, y este es el dato más preciso para

valorar el estado de las células de Leydig y el tubo seminífero y el único que nos sirve para hablar de hiperplasia de células de Leydig, hipoplasia ó número normal.

La célula de Leydig es considerada por algunos autores (54) como "célula diana" en el Varicocele. La alteración varicosa de los vasos intratesticulares, en nuestra opinión, determinaría unos cambios en el intersticio, con edema a ese nivel, cuya consecuencia sería una mayor dilución de sus elementos, tanto metabolitos como hormonas, lo que conllevaría un aumento en el número de las células de Leydig en un intento de paliar esta dilución, y no suficiente por otra parte para evitar el daño tubular resultante del desequilibrio de las interacciones paracrinas.

Por considerarla una célula clave en la patogenia de las lesiones testiculares en el Varicocele y por no existir, hasta el momento, ningún otro tipo de recuento del número total de estas células por testículo, es por lo que hemos llevado a cabo este trabajo. Por ello hemos reslizado, por un lado, un conteaje por unidad de superficie y volumen en el material de biopsia y autopsia, y por otro lado, un cálculo por testículo en el material de autopsia, previo cálculo del volúmen testicular según la fórmula de Floderus (38), que es equivalente al obtenido mediante el cálculo volumétrico por desplazamiento de agua, si le descontamos a éste el 4% correspondiente a la túnica albugínea. Esta fórmula se ha aplicado en material previamente fijado, cortado y teñido pero el posi-

ble error de fijación, inclusión y tinción, es el mismo para todo el material, incluido el grupo control, tomado de Nistal (96), de su material fijado en líquido de Bouin, ya que hemos seguido la misma sistemática.

La reciente demostración de que no existe hiperplasia de células de Leydig en el Síndrome de Klinefelter (96), al realizar el cálculo celular por volumen testicular, es un hecho más que apoya la importancia de tener en cuenta este parámetro.

A la vista de nuestros resultados se puede apreciar que existe franca **hiperplasia de células de Leydig** por testículo que, en absoluto, era apreciable, cuantitativamente, por unidad de volumen testicular, ya que no se vieron diferencias significativas entre los diferentes grupos con el control, respecto a este parámetro; la apariencia, pues, de hiperplasia que se describía en múltiples artículos (16,32,33,36,110) queda confirmada; no ha ocurrido así en otros tipos de patología (96) en la que esa apariencia ha resultado ficticia; llama la atención que la hiperplasia no es tan manifiesta en el grupo de autopsia de personas de mayor edad, en el que predominaba la imagen "en mosaico" ó bien, la hipoespermatoogénesis marcada, con una mayor alteración tubular; esto creemos sería debido a que llega un momento en que la esclerosis tubular está tan avanzada y la alteración del epitelio germinal es tan mar-

cada que fallan las células de Sertoli y de Leydig, bien porque estén carentes de estímulos o porque los tengan en menor intensidad que en el resto de los grupos.

La relación entre la alteración en el número de células de Leydig y la probable modificación de su función, en el Varicocele, fue comentada por primera vez en 1.971, año en que Raboch y Starka (114), encontraron en los 37 pacientes que estudiaron con Varicocele que la testosterona plasmática era inferior a aquella detectada en los hombres fértiles sanos; estos hallazgos creyeron que estaban en contradicción con la hiperplasia de células de Leydig que habían observado Dubin y Hotchkiss (32) y creyeron que podría ser debido a un estado hipergonadotrópico y que la hiperplasia que se observaba en las células de Leydig podía ser hipofuncional.

Swerdloff y Wash, en 1.975 (139), midieron la FSH, LH, testosterona y estradiol en sangre periférica y en la vena testicular, en pacientes con Varicocele y en un grupo control sano y no encontraron diferencias entre ambos grupos, por lo que concluyeron que la función de la célula de Leydig y de la hipófisis era normal.

Pujol, en 1.984 (110), encontró alterados los niveles de testosterona y de estradiol en muchos pacientes con Varicocele y pensó que ello apoyaría la teoría de que la anomalía de las células de Leydig podía ser debida a una disfunción de

esta células con base morfológica y funcional.

Yoshida (158), en dos grupos dispares de Varicocelo, uno con "hiperplasia" de células de Leydig y otro son "hipo-plasia" encontró en el primer grupo, correlación entre la concentración testicular de testosterona y el número de células de Leydig, no viéndola en el segundo grupo y no existiendo en ninguno de los dos grupos, entre los valores plasmáticos de LH ó testosterona y el valor testicular de testosterona.

Oshima (99), utilizando técnicas "in vitro", demostró una relación entre la densidad de células de Leydig y la testosterona intratesticular, como representativo de su función, pero pensó, que existirían otros factores extrínsecos y que las conclusiones no se podían basar solamente en las determinaciones de la testosterona intratesticular.

Mc. Faden y Mehan (76) en 1.978, tras lograr el primer embarazo recogido en la literatura, en un caso con hiperplasia de células de Leydig, comentaron que todavía no se conocía cual era el factor endocrinológico asociado a la hiperplasia de las células de Leydig.

A la vista de lo expuesto, vemos que no sólo son importantes en el Varicocelo la LH y la testosterona (53), sino que también lo son todos los factores anteriormente descritos,

que influyen a nivel intersticial, puesto que en todos los casos se observa:

- vasodilatación y esclerosis de los vasos y
- edema intersticial.

Si la célula de Leydig es estimulada por factores que proceden de la sangre (LH, prolactina, ACTH) y por otros factores intersticiales (124) insistimos en que, si hay edema, hay una menor concentración de todos ellos y debido a la esclerosis vascular tienen también una mayor dificultad de paso; que, por lo tanto, para suplir estos inconvenientes deberían estas células de sufrir una hipertrofia y/o una hiperplasia, requiriendo un mayor estímulo de LH puesto que sería uno de los productos que sufriría una dilución intersticial, afectando esto también a los propios productos de la célula de Leydig que se verían disminuidos en sangre periférica y en líquido intersticial; esta hiperplasia sería por tanto compensadora, para que se produjera correctamente la **regulación paracrina testicular**.

Esta teoría, en cierto sentido, la comparten otros autores (106,110) los cuales, hablan de que la probable parada de la maduración de espermátides ó espermatoцитos en el Variocoele, con la consiguiente Oligozoospermia, puede ser debida a una alteración en esta regulación paracrina testicular, en la que jugaría un papel importante la célula de Leydig en sus interrelaciones con el tubo seminífero y los vasos.

El hecho de que pensáramos que las alteraciones funda-

mentales en el Varicocele tenían lugar en el interior del testículo y que la cuantificación de las células de Leydig podría aportar algo de luz a las investigaciones, nos llevó a hacer el recuento dando un paso más adelante, en cuanto a valorar su posible estado funcional. Esta cuantificación, con la que hemos demostrado la hiperplasia, la hicimos en secciones teñidas con la técnica P.A.P. para la demostración de testosterona intracitoplasmática, puesto que esta técnica se puede usar en material incluido en parafina y además es de gran sensibilidad, superior, incluso en algunos casos, al radio-inmuno-ensayo (79), existiendo suficiente literatura acerca de su utilidad (70,101,130,142); que la tinción la hayamos visto más o menos intensa, con grumos más gruesos ó más finos, no lo hemos valorado a la hora de hacer el recuento, puesto que al tratarse de células endocrinas, pasan por fases con diferente actividad y no por ello, estimamos no deban ser tenidas en cuenta; han sido muy escasas, no obstante, las que a simple vista no se teñían y éstas se han encontrado en número ligeramente superior respecto a los otros grupos en los pacientes de mayor edad. Sirvent (131) sí realizó un recuento de estas células no teñidas y encontró que no sobrepasaban el 16% en el testículo con Varicocele, siendo su número algo mayor en el contralateral, 18%, cifras que no resultaron significativas en su análisis estadístico, apuntando el escaso valor de esta apreciación.

En el momento actual, la confirmación de nuestra hipó-

tesis acerca de por qué se produce hiperplasia de las células de Leydig, no se puede llevar a cabo en el hombre.

Los trabajos experimentales realizados con roedores (8,45,125,126,127,141,147,155), sugieren que nuestra hipótesis podría ser cierta en el hombre. En este tipo de animales, estudiar el tipo de relaciones entre la célula de Leydig y el tubo seminífero, resulta sencillo por la propia estructura del tubo, puesto que cada estadio celular ocupa un amplio espacio en el tubo seminífero. En el hombre, cada estadio, ocupa muy poco espacio, y además, tienen todos ellos una disposición elicoidal y en un corte transversal del tubo se observan múltiples asociaciones, por lo que existen muy pocas posibilidades de establecer una relación entre la fase del ciclo del epitelio seminífero y la hiperplasia de células de Leydig; en el ratón sí se ha visto la relación entre hiperplasia y mayor demanda de testosterona, puesto que junto a tubos en estadios VII y ~~VIII~~ momento culminante de la espermatogénesis, se han visto focos de hiperplasia de células de Leydig. Pensamos que, en un futuro, podrían orientarse en este sentido las investigaciones, si se encuentran mecanismos precisos de observación de estos compartimentos del tubo y del intersticio.

Creemos que podrá llegar a demostrarse, pues, nuestra teoría de que esta **hiperplasia de las células de Leydig** que se evidencia en el **Varicocelo**, es de tipo compensador, frente a la dilución de los productos de la sangre y de la propia célu-

la de Leydig que tiene lugar en un intersticio edematoso, con gruesos vasos esclerosos y ectásicos y que ni siquiera es suficiente para evitar el deterioro a nivel de célula de Sertoli y de epitelio germinal.

6.- CONCLUSIONES

6. CONCLUSIONES.

1. LOS PACIENTES CON VARICOCELE PRESENTAN HIPERPLASIA DIFUSA DE LAS CELULAS DE LEYDIG.
2. ESTA HIPERPLASIA AFECTA TANTO AL TESTICULO AFECTO DE VARICOCELE COMO AL CONTRALATERAL.
3. COMPARADOS AMBOS LADOS NO EXISTEN DIFERENCIAS SIGNIFICATIVAS ENTRE ELLOS, EN LA EDAD MEDIA DE LA VIDA.
4. AUNQUE LA HIPERPLASIA SE HA OBSERVADO EN LOS PACIENTES DE TODAS LAS EDADES, TIENDE A SER ALGO MENOR EN LOS DE MAYOR EDAD EN EL LADO AFECTO DE VARICOCELE.
5. LOS CALCULOS DE DENSIDAD NUMERICA POR UNIDAD DE SUPERFICIE Y VOLUMEN, NO SON REPRESENTATIVOS DE LO QUE OCURRE EN LA TOTALIDAD DEL TESTICULO.
6. LOS CALCULOS POR VOLUMEN TESTICULAR SON LOS UNICOS QUE PERMITEN DECIR QUE HAY HIPERPLASIA E INCLUSO MATIZAR EL GRADO DE LA MISMA.

7. RESUMEN.

La patogénesis de las lesiones en el Varicocele han sido ampliamente debatidas en la literatura, no existiendo en el momento actual, una explicación convincente.

La mayoría de los trabajos recientes se han centrado en las células de Leydig. Se ha observado en estudios cuantitativos tanto aumento en su número como disminución, sin que exista relación entre estos aumentos o disminuciones con la intensidad del Varicocele ni con las lesiones del tubo seminífero.

El concepto de hiperplasia ó hipoplasia de células de Leydig se ha utilizado basándose, en los trabajos más elaborados, en recuentos por unidad de área o volumen, metodología no válida para conocer globalmente el estado de las células de Leydig.

En el trabajo que hemos realizado, no sólo hemos hecho ésto último, en el material de biopsia y autopsia, sino que, además, hemos calculado el número de células de Leydig por volumen testicular utilizando el material de autopsia y todos los recuentos los hemos llevado a cabo con técnicas clásicas y también con técnicas P.A.P. para demostrar testosterona intracitoplasmática.

Nuestros hallazgos permiten asegurar que en el **Varicocele** existe siempre una **hiperplasia de células de Leydig**, cuya explicación probablemente estaría en el microclima intersticial que se produce por el éstasis crónico, que ocurre en este tipo de patología y que acarrearía una disfunción de la regulación paracrina, con el consiguiente deterioro del epitelio del tubo seminífero.

BIBLIOGRAFIA

1. AAFJES JH y JCM VAN DER VIJVER : Fertility of men with and without a varicocele. Fertil Steril 43:901-904,1985.
2. AGGER P Y SG JOHNSEN: Quantitative evaluation of testicular biopsies in Varicocele.Fertil Steril 29:52-57,1.978.
3. AHMAD KN,B LENNOX y WS MACK : Estimation of the volume of Leydig cells in man. Lancet 2:461-464,1969.
4. AHMAD KN,JRW DYKES,MA FERGUSON-SMITH,B LENNOX Y WS MACK : Leydig cell volume in chromatin-positive Klinefelter's Syndrome. J Clin Endocrinol 33:517-520,1.971.
5. ANDO S,C GIAGHETTO, E BERALDI y ML PANNO, A LOMBARDI, G SPOSATO Y G GOLPI: The influence of age on Leydig cell function in patients with Varicocele. Int J Androl 7: 104-108,1.984.
6. ASA SL , TA BAYLEY , K KOVACS Y E HORVATH : Leydig cell hyperplasia due to a testicular embrional carcinoma producing human chorionic gonadotropin.Andrologia 16: 146-155. 1.984.
7. BARDIN CW, C SHAHA, J MATHER, Y SALOMON, AN MARGIORIS, AS LIOTTA, I GERENDAI, CL CHEN y DT KRIEGER : Identification

and possible function of pro-opiomelanocortin-derived, peptides in the testis. *Annals NY Acad Sci.* 438:346-364. 1984.

8. BARTLETT JMS, J KERR y RM SHARPE: The effect of selective destruction and regeneration of rat Leydig cells on the intratesticular distribution of testosterone and morphology of the seminiferous epithelium. *J Androl* 7:240-253. 1.986.
9. BAYO OCHOA A y J LAZARO PEREZ :Valoracion de los trastornos secretores. Correlación histológica-hormonal. Actas del II Congreso Nacional de Andrologia. Barcelona, 163-174. Marzo 1.985.
10. BECK JS y JM ANDERSON : Quantitative methods as an aid to diagnosis in histopathology. En *Recent Advances in Histopathology*, n.13. Editado por PP Anthony y RN Mac Swae. Churchill Livingstone. New-York: 255-265. 1.987.
11. BERNAT R. JJ SIRVENT. A PUJOL. E MARTI. M BONNIN Y MA NAVARRRO.: Correlacion morfofuncional del testiculo humano en la fertilidad: II Morfometria de la ultraestructura de las celulas intersticiales infértiles afectos de criptorquidia unilateral o de Varicocele idiopático. Actas del II Congreso Nacional de Andrologia. Barcelona: 192-205. 1.985.

12. BERNAT R, JJ SIRVENT, A PUJOL, E MARTI, M BONNIN Y MA NAVARRO.: Morfometria de la ultraestructura de las celulas intersticiales de infertiles afectos de Criptorquidia unilateral o de Varicocele idiopatico. Comunicacion al II Congreso Nacional de Andrologia. Libro de Ponencias y Comunicaciones. Barcelona:192-295. 1.985.
13. BIGOT JM y O UTZMANN : La Varicocele droite:apport de la phlebographie spermatique . Urologie 89: 121-131. 1.983.
14. BOUIN P : Recherches sur les cellules intersticielles du testicule des mamiferes. Arch Zool Exp Gen 1: 437-523.1.903 (Citado por R Bernat (11)).
15. BROWN JS, L DUBIN y RS HOTCHKISS : The Varicocele as related to fertility. Fertil Steril 18: 46-47. 1.967.
16. BUCH JP y WJ CROMIE : Evaluation and treatment of the preadolescent Varicocele. Urologic Clinics of North America.12: 3-12. 1.985.
17. CAMERON DF, FE SNYDLE , MH ROSS y DV DRYLIE : Ultrastructural alterations in the adluminal testicular compartment in men with Varicocele. Fertil Steril 33: 526-533. 1.980.

18. CAMERON DF y FE SNYDLE : The blood-testis barrier in men with Varicocele. A Lanthanum tracer study. Fertil Steril 34:255-258. 1.980.
19. CAMERON DF y FE SNYDLE : Ultrastructural surface characteristics of seminiferous tubules from men with Varicocele. Andrologia 1: 425-433. 1.982.
20. CLARKE BG : Incidence of Varicocele in normal men and among men of different ages. JAMA 198: 195-196. 1.966.
21. COCKETT ATK.H TAKIHARA y MJ COSENTINO : The Varicocele. Fertil Steril. 41: 5-11. 1.984.
22. CODESAL J.L SANTAMARIA, E FUENTES y M NISTAL : Varicocele: lesiones histologicas testiculares. Patologia 18: 391-399. 1.985.
23. COHEN MS, L PLAINE y JS BROW : The role of internal spermatic vein plasma catecholamines determinations in subfertile men with Varicocele. Fertil Steril 26:1243-1249. 1.975.
24. COMHAIRE F y A VERMEULEN : Varicocele sterility. Cortisol and catecholaminas. Fertil Steril 25: 88-95. 1.974.

25. COMHAIRE F : Radiology anatomy of the internal spermatic vein(s) in 200 retrograde venograms. Int J Androl 4: 379-387, 1.981.
26. CHARNY CW : Effect of Varicocele on fertility. Fertil Steril 13: 47- 56, 1.962.
27. CHARNY CW y S BAWM : Varicocele and infertility. JAMA. 204: 1165-1172. 1.968.
28. CHIDEKEL N :Female pelvic venis demonstrated by selective renal phlebography with particular reference to pelvis varicosities. Acta Radiol (Diagn) 7:193-211. 1.968.
29. CHRISTENSEN AK : Leydig cells.En:Male reproductive system (Handbook of Physiology. Endocrinology. Vol 5).Editado por Williams and Wilkins. Baltimore: 35-41.1.975.
30. CHRISTENSEN AK y C PEACOK : Increase in Leydig cell number in testes of adult rats treated chronically with an excess of human chorionic gonadotropin. Biol Reprod 22: 383-391. 1.980.

31. DE KRETZER DM: Crystals of Reinke in the nuclei of human testicular interstitial cells. *Experientia* 24: 587-588, 1.968.
32. DUBIN L y RS HOTCHKISS : Testis biopsy in subfertile men with Varicocele. *Fertil Steril* 20: 50-57. 1.969.
33. DUBIN L y RD AMELAR : Varicocele size and results of varicocelectomy in selected subfertile men with Varicocele. *Fertil Steril* 21: 606-609. 1.970.
34. DYKES JR: Histometric assessment of human testicular biopsies. *J Path Bact* 97: 429-440. 1.969.
35. EL-GOHARY M A: Boyhood Varicocele: an overlooked disorder. *Ann R Coll Surg Engl* 66: 36-38. 1.984.
36. ETRIBY A. SM GIRGIS, H HEFNAWY y AA IBRAHIM: Testicular changes in subfertile males with Varicocele. *Fertil Steril* 18: 666-671. 1.967.
37. FABBRINI A. V SANTIENNA. S FRANCAVILLA. S MOSCARDELLI. F FRANCAVILLA. N INCORVATI. C DE MARTINO y M BELLOCI: Leydig

cell morphology and function in Varicocele. En : Oligozoospermia. Recent progress in andrology. Editado por G Frajese, E Hafer, C Conti y A Fabbrini. New York: 77- 92, 1.981.

38. FLODERUS S: Untersuchungen ber den Bau der menschlichen Hypophyse mit besonderer Bercksichtigung der quantitativen mikromorphologischen Verhltnisse. Acta Pathol Microbiol Scand (Suppl) 53: 1-276, 1.944.
39. FRANCAVILLA S, B BRUNO, M MARTINI, S MOSCARDELLI, G PROPERZI, F FRANCAVILLA, V SANTIEMMA y A FABRINI: Quantitative evaluation of Leydig cells in testicular biopsies of men with Varicocele. Arch Androl 16: 111-117, 1.986.
40. FREIRE FR y CRD NAHOWN : Endocrine evaluation in infertile men with Varicocele. Andrologia 13: 395-404, 1.981.
41. GIRGIS SM, A ETRIBY, AA IBRAHIM y SA KAIL: Testicular biopsy findings in patients with impaired fertility. Fertil Steril 20: 467-477, 1.969.
42. GLEZERMAN M: A short historical review and comparative result of surgical treatment for varicocele. En Varicocele and male infertility II. Editado por M Glezerman y EW Jecht Springer-Verlag, Berlin: 87-93, 1.984.

43. GOLDBLATT PJ, GW GUNNIN : Ultrastructure of the interstitial cell of Leydig, stimulated and unstimulated Ann Clin Lab Sci 15: 441-459, 1.985.
44. GOTOH M.K MIYAKE y H MITSUYA : Leydig cell hyperplasia in criptorchid patients: quantitative evaluation of Leydig cells in undescended and contralateral scrotal testes. Urol Res 12: 159-164, 1.984.
45. GULDENAAR SEF y BT PICKERING : Immunocytochemical evidence for the presence of oxytocin in rat testes. Cell and Tissue Research 240: 485-487, 1985.
46. HADVZISELIMOVIC F: Im Kindesalter erkeimbare ursachen der mannlichen sterilitat. Schweiz Rundschau Med (Praxis) 72: 316-323, 1.983.
47. HAFEZ MM y P HEIDGER: Stereological study of Leydig cell density in the guinea pig testis. Arch Androl 17: 1-7, 1.936.
48. HAIDER SG, D PASSIA , G SERVOS y H HETPWER : Electron microscopic evidence for deep invaginations of the lamina propia towards the seminiferous tubule lumen in a patient with Varicocele. Int J Androl 9: 27-37, 1.986.

49. HATAKEYAMA S, T TAKIZAWA y Y KAWAHARA: Focal atrophy of the seminiferous tubule in the human testis. Acta Pathol Jpn 29: 901-910, 1979.
50. HELLER CG, MF LALLI, JE PEARSON y DR LEACH : A method for the quantification of Leydig cells in man. J Reprod Fertil 25: 177-184, 1971.
51. HELLER CG y DR LEACH : Quantification of Leydig cells and measurement of Leydig cell size following administration of human chorionic gonadotrophin to normal men. J Reprod Fertil 25: 185-192, 1971.
52. HIENZ HA, J VOGGENTHALER y L WEISSBACH : Histological findings in testes with Varicocele during childhood and their therapeutic consequences. Eur J Pediatr 133: 139-146, 1980.
53. HIRSH AV, JPP TYLER y G LANDON: Testicular testosterone concentration, interstitial cell density and spermatogenesis in infertile men. Int J Androl 4: 409-420, 1981.
54. HOEFMAN NH, B HILSCHER, W PASSIA y SG HAIDER : Histological morphometrical and enzyme histochemical studies on Varicocele orchopathy. En: Varicocele and male infertility. Editado

por EW Jecht y E Zeitler -Springer-Verlag. Berlin: 27-32. 1.982.

55. HORNSTEIN OP: Zur Klinik und histopathologie des männlichen primären hypogonadismus. Hodenparenchymschaden durch Varicocele. Arch Klin Exper Dermat 218: 347-383. 1.964.
56. HORNSTEIN OP: Orchipathia e Varicocele. En: Varicocele and male infertility. Editado por EW Jecht y E Zeitler. Springer-Verlag. Berlin: 17-26. 1.982.
57. HOWARDS SS : Varicocele. Fertil Steril 41: 356-358. 1.984.
58. HSU SM, L RAINE y M FANGER : A comparative study of the PAP method and avidin-biotin complex method for studying polypeptide hormones with radioimmunoassay antibodies. Am J Clin Pathol 75: 734-738. 1.981.
59. HUDSON RWM, VA CRAWFORD y DE MC KAY : The gonadotropin response of men with varicocele to a fourhour infusion of gonadotropin-releasing hormone. Fertil Steril 36: 633-637. 1.981.

60. HUDSON RW, RA PEREZ-MARRERO, VA CRAWFORD y DE Mc KAY : Hormonal parameters of men with Varicoceles before and after Varicocelectomy. Fertil Steril 43: 905-910, 1.985.
61. HUDSON RW, RA PEREZ-MARRERO, VA CRAWFORD y DE Mc KAY: Hormonal parameters in incidental Varicoceles and those causing infertility. Fertil Steril 45: 692-700. 1.986.
62. IBARZ L, MC RUIZ, V ORUS, MA LOPEZ, G LLAMAZARES y A SOLER : Consideraciones sobre la biopsia testicular en el Varicocele. Comunicacion a la primera Reunion Nacional de la Asociacion Española de Andrologia. Libro de Ponencias y Comunicaciones. Sevilla: 420.Marzo 1.982.
63. IBRAHIM AA, HA AWAD, S EL-HAGGAR y BA MITAWI : Bilateral testicular biopsy in men with Varicocele. Fertil Steril 28: 663-667, 1.977.
64. ITO H, H FUSE, H MINAGAWA, K KAWAMURA, M MURAKAMI y J SHIMAZAKI: Internal spermatic vein prostaglandins in Varicocele patients. Fertil Steril 37:218-222, 1.982.
65. JETCH EW y E ZWITLER : The Varicocele: clinical aspects. En: Varicocele and male infertility. Editado por EW Jetch y E Zwitler. Springer-Verlag. Berlin: 13-18, 1.982.

66. JENNY P y FE HADZISELIMOVIC : Die bedeutung der Varikocoele in Kindesalter. The importance of Varicocoele in children. Z Kinderchir 35: 90-92, 1.982.
67. JOHNSEN SG y P AGGER : Quantitative evaluation of testicular biopsies before and after operation for Varicocoele. Fertil Steril 29: 58-63, 1.978.
68. JONES TM: Direct inhibition of Leydig cell function by stradiol. J Clin Endocr Metab 47: 1368-1373, 1.978.
69. KORMANO M, K KAHANPAA, U SVINHUEVUN y E TAHTI : Thermography of Varicocoele. Fertil Steril 21: 558-563, 1.970.
70. KURMAN RJ, D ANDRADE, U GOEBELSMANN y CR TAYLOR: An immunohistological study of steroid localization in Sertoly-Leydig tumors of the ovary and testis. Cancer 42: 1772-1783, 1.978.
71. LECOMTE P, JL LEGRAND, J LANSAC, N FRAPPE y MJ TAHRANNE : Cure de Varicocoele et fecondite du couple. J Gyn Obst Biol Repr 12: 291-299, 1.983.
72. LEYDIG F: Anatomie der mannlichen. Geschlechtsorgane und Analdrsen der Sugethiere. Ztschr Wiss Zool 2: 1-57, 1.850.
(citado por WB Ober (98)).

73. LU CC y A STEINBERGER: Effects of estrogen on human seminiferous tubules: light and electron microscopic analysis. *Am J Anat* 153: 1-14. 1978.
74. LUDWIG G : Pathogenesis of Varicocele. En : Varicocele and male infertility. Editado por EW Jech y E Zeitler. Springer Verlag. Berlin: 6-12, 1982.
75. MASEKI Y, K MIYAKE y H MITSUYA : Mastocytosis occurring in the testis from patients with idiopathic male infertility. *Fertil Steril* 36: 814-817. 1.981.
76. Mc FADDEN MR y DJ MEHAN : Testicular biopsies in 101 cases of Varicocele. *J Urol* 119: 372-374. 1.978.
77. Mc LEOD.: Seminal cytology in the presence of Varicocele. *Fertil Steril* 16: 735-747. 1.965.
78. MENDIS-HANDAGAMA SMLC, GP RISBRIDGER y DM DE KRETZER : Morphometric analysis of the components of the neonatal and the adult rat testis interstitium. *Int J Androl* 10: 525-534. 1.987.

79. MESA-TEJADA R. RR PASCAL y CM FENOGLIO : Immunoperoxidase: A sensitive immunohistochemical technique as a "special stain" in the diagnostic pathology laboratory. Human Pathol 8: 313-320. 1.977.
80. MEYHFER W y J WOLF: Varikocelo und Fertilität. Dermatol Wochenschr. 142: 1116-1121. 1960.
81. MOLENAAR R. DG DE ROOIJ , FFG ROMMERTS y HJ VAN DER MOLEN : Repopulation of Leydig cells in mature rats after selective destruction of the existent Leydig cells with ethylene dimethane sulfonate is dependent on luteinizing hormone and not follicle stimulating hormone. Endocrinology 118: 2546-2554. 1.986.
82. MOORE CR y WJ QUICK: The scrotum as a temperature regulator for the testes. Am J Physiol 68: 70-79. 1924.
83. MORI H y A KENT CHRISTENSEN : Morphometric analysis of Leydig cells in the normal rat testis. J Cell Biology 84: 340-354. 1.980.
84. NAMIKI M. M NAKAMURA. A OKUYAMA. T SONODA. Y NISHIMUNE, D TAKATSUKA y K MATSUMOTO: Influence of temperature on the

function of Sertoli and Leydig cells of human testes. Fertil Steril 47: 475-480, 1.987.

85. NARAYAN P. K AMPLATZ y R GONZALEZ : Varicocele and male subfertility. Fertil Steril 360:92-97, 1.981.
86. NEAVES WB, L JOHSON, JC PORTER, CR PARKER JR Y CS PETTY : Leydig cells numbers, daily sperm production, and serum gonadotropin levels in aging men. J Clin Endocrinol Metab 59: 756-763, 1.984.
87. NELSON W: Interpretation of testicular biopsy. JAMA 151: 449-460, 1953.
88. NETTO NR Jr. GC LEMOS y GM DE GOES : Varicocele: Relation between anoxia and hypospermatogenesis. Int J Fertil 22: 174-178, 1.977.
89. NISTAL M: Esterilidad masculina secundaria a la presencia de testículos retractiles. Estudio anatomopatológico de las biopsias testiculares de catorce pacientes. An Anat 26: 305-316, 1.977.

90. NISTAL M, R PANIAGUA y I LOPEZ-PAJARES : Ultrastructure of Leydig cells in Klinefelter's Syndrome with 48,XXYY Karyotype. *Virchows Arch B Cell Path* 28: 39-46, 1.978.
91. NISTAL M y R PANIAGUA : Histogenesis of human extraparenchymal Leydig cells. *Acta Anat* 105: 188-197, 1.979.
92. NISTAL M y R PANIAGUA : Leydig cell differentiation induced by stimulation with HCG and HMG in two patients affected with hypogonadotropic hypogonadism. *Andrologia* 11:211-222, 1.979.
93. NISTAL M, R PANIAGUA, J REGADERA y L SANTAMARIA : Obstruction of the tubuli recti and ductuli efferentes by dilated veins in the testes of men with Varicocele and its possible role in causing atrophy of the seminiferous tubules. *Int J Androl* 7: 309-323, 1.984.
94. NISTAL M y R PANIAGUA : Vascular disorders of the testis. En *Testicular and epididymal pathology*. Editado por Thiem-Stratton. New York: 201-226, 1.984.
95. NISTAL M y R PANIAGUA : Infertility in adult males with retractile testes. *Fertil Steril* 41: 395-403, 1.984.

96. NISTAL M. L SANTAMARIA y R PANIAGUA : Quantitative and ultrastructural study of Leydig cells in Klinefelter's Syndrome. J Pathol 146: 323-331. 1.985.
97. NISTAL M. J CODESAL, L SANTAMARIA y R PANIAGUA: Correlation between spermatozoon numbers in spermiogram and seminiferous epithelium histology in testicular biopsies subfertile men. Fertil Steril 48: 507-509. 1987.
98. OBER WB, CH SCIAGURA : Leydig, Sertoli and Reinke: Three anatomists who were on the ball. Pathol Annual part. 1.16: 1-13. 1.981.
99. OSHIMA H, NR NANKIN , P TROEN, K YOSHIDA y K OCHIAI : Leydig cell number and function in infertile men. En: The Testis in Normal and Infertile Men. Editado por P Troen y NR Nankin Raven Press. New York: 445-470. 1.977.
100. OSTER J: Varicocele in children and adolescents. Scand J Urol Nephrol 5: 27-32. 1.971.
101. PALACIN A: Tecnicas inmunohistoquimicas. Editado por ATOM. Barcelona: 75-80. 1.984.

102. PANIAGUA R. M NISTAL y P BRAVO : Leydig cell types in primary testicular disorders. Human Pathol 15: 181-190, 1.984.
103. PANIAGUA R. A MARTIN, M NISTAL y P AMAT : Testicular involution in elderly men: comparison of histologic quantitative studies with hormone patterns. Fertil Steril 47: 671-679, 1.987.
104. PAYER AF: Ultrastructural classification of paracrystalline inclusions in untreated and strogen treated human Leydig cells. Anat Rec 198: 175-182, 1.980.
105. PESCE CM y A REALE : Testis morphometry in Varicocele. Arch Androl 15: 193-197, 1.985.
106. POIZAT R y A STEG: Varicocele et infertilite. Sem Hp Paris 59: 1341-1347, 1.983.
107. PONTONNIER F, A MONSAT y P BENNET : Varicocele et sterilite masculine. J Urol Nephrol 81: 604-608, 1.975.
108. PONTONNIER F y H NAVRATIL : Varicocele et infertilite. J Urol 90: 266-282, 1.984.

109. PUIGVERT A, D RUANO GIL y J SAN MOLINA : Del Varicocelo.
Acta Urol Esp 8: 89-92. 1.984.
110. PUJOL A, J RODRIGUEZ TOLRA, MA NAVARRO, M BONNIN, JJ SIR-
VENT, M PLADELLORENS y R BERNAT : The hormonal pattern in
Varicocelo and its relationship with the findings of testi-
cular biopsy: Preliminary results. Br J Urol 54:300-
304,1.982.
111. PURAS A,R GONZALEZ FANDOS, JM MARTINEZ-PENUELA, JM EZPELETA
y JL SEBASTIAN : Biopsia testicular: Experiencia en la
sistemática de estudio en el Servicio de Anatomía Patológica
de la Residencia Sanitaria "Virgen del Camino", de Pamplona.
Comunicación a la 1.Reunión Nacional de la Asociación Espa-
ñola de Andrología. Libro de Ponencias y Comunicaciones.
Sevilla: 423. 1.982.
112. PURAS GIL A: La biopsia de testículo: Parámetros interpreta-
tivos. Ponencia al Curso sobre temas andrológicos. Editado
por Jose Luis Arrondo. Pamplona: 129.Mayo 1.985.
113. PURAS GIL A: Conceptos actuales en el estudio de la correla-
ción hormonal con la histopatología del testículo en el
varón infértil. Ponencia al Congreso Nacional de la Sociedad

Española de Fertilidad. Editado por Cuadernos Serono. Serie Reproducción. Pamplona: 52-79. Junio 1.986.

114. RABOCH J y L STARKA: Hormonal testicular activity in men with a Varicocele. Fertil Steril 22: 152-155, 1.971.
115. REDONDO E: Tipos de varicocele individualizados según bases morfológicas. Tesis Doctoral. Facultad de Medicina. Universidad Autónoma de Madrid, 1.985.
116. REGADERA J, M NISTAL y R PANIAGUA : Testis, epididymis and spermatic cord in elderly men. Arch Pathol Lab Med 109: 663-667, 1.985.
117. REINKE F: Beitrge zur histologie des menschen I. Uber Krys-talloidbildungen in den interstitiellen zellen des menschlichen Hodens. Arch Mikr Anat 47: 34-44, 1.896. (citado por WB OBER (98)).
118. ROBINSON D y J ROCK : Intrascrotal hypertermia induced by scrotal insulation: effect on spermatogenesis. Obstet Gynec 29: 217-223, 1.967.

119. RODRIGUEZ-RIGAU LJ. DE WEISS. A ZUKERMAN. ME GROTJAN. KD SMITH y E STEINBERGER : A possible mechanism for the detrimental effect of Varicocoele on testicular function in man. Fertil Steril 30:577-581. 1.978.
120. SARGENT JW y JR Mc DONALD : A method for the quantitative estimate Leydig cells in the human testis. Proc Staff Meet Mayo Clin 3: 249-251. 1.948.
121. SCHOLLER R. K NAHOUL. M CASTANIER. J ROTMAN y J SALAT-BAROUX : Testicular secretion of conjugated and unconjugated steroids in normal adults and in patients with Varicocoele. J Steroid Biochem 20: 203-215. 1.984.
122. SEBASTIAN JL. R GUARCH. A PURAS. L BENTO. Y RUIZ DE AZUA y E URBIOLA : Lesiones histológicas en el Varicocoele idiopático infantil. Comunicación al LI Congreso Nacional de Urología. Libro de Comunicaciones. Pamplona. Mayo 1.986.
123. SHARPE R: Effets cellulaires directs de LHRH sur l'ovarie et le testicule. Contraception-Fertilité Sexualité 11: 677-686. 1.983.

124. SHARPE RM y I COOPER: Intratesticular secretion of a factor (s) with major stimulatory effects on Leydig cell testosterone secretion in vitro. Mol Cell Endoc 37: 159-168. 1984.
125. SHARPE RM: Paracrine control of the testis. En: Clinics in Endocrinology and Metabolism 15: 185-207. 1986.
126. SHARPE RM. JB KERR, HM FRASER y JMS BARTLETT : Intratesticular factors and testosterone secretion. Effect of treatments that alter the level of testosterone within the testis. J Androl 7:180-189. 1.986.
127. SHARPE RM. JB KERR, I COOPER y JMS BARTLETT: Intratesticular factors and testosterone secretion: the effect of treatment with ethane dimethane-sulphonate (EDS) and the induction of seminiferous tubule damage. Int J Androl 9: 285-298. 1986.
128. SHIMP WS, AL SCHUTZ y JR HASTINGS : Leydig cell tumor of the testis with ginecomastia and elevated strogens levels. Am J Clin Pathol 67: 562-566.1.977.
129. SIRVENT JJ, S PLADELLOREN, A PUJOL y R BERNAT : Histometric assessment and ultrastructure of testis with idiopatic Varicocele. Comunicacion al VII th European Congress of Pathology, Valencia. Mayo 1.979.

130. SIRVENT JJ, D GONZALEZ, M GUIONET, MA NAVARRO Y RODRIGUEZ, A PUJOL, MT SALVADOR, R BERNAT y M BONNIN : Correlacion morfofuncional del testiculo humano en la infertilidad. I. Morfometria y correlacion funcional de los hallazgos obtenidos con la inmunohistoquímica en testiculos de pacientes con Varicocele idiopático y Criptorquidicos bilaterales. Actas del II Congreso Nacional de Andrologia. Barcelona: 175-191. Abril 1.985.
131. SIRVENT JJ: Estudio morfofuncional de la celula de Leydig y su relacion con el túbulo seminifero testicular. Tesis doctoral. Universidad de Barcelona. 1.986.
132. SDERSTRM KO: Leydig cell hyperplasia. Arch Androl 17: 57-65. 1.986.
133. SOHVAL AR, JK GABRILOVE y J CHURG : Ultraestructura of Leydig cell paracrystalline inclusions; possibly related to Reinke crystals, in normal human testis. Z Zellforsch 142: 13-26. 1.973.
134. STEARNS EL, JA Mc DONNELL, BJ KAUFMAN, R PADUA, TS LUCHAN, JSD WINTER y C FAIMAN : Declining testicular function with age. Hormonal and clinical correlates. Am J Med 57: 761-766. 1.974.

135. STEINBERGER E y DY TIJOE: A method for quantitative analysis of human seminiferous epithelium. Fertil Steril 19: 960-967. 1968.
136. STEPHENSON JD y EJ O'SHANGHENESSY : Hypospermia and its relationship to Varicocele and intrascrotal temperature. Fertil Steril 19: 110-117. 1.968.
137. STERNBERGER LA. PH HARDY Jr. JJ CUCULIS y HC MEYER : The unlabeled antibody enzyme method of immunohistochemistry.- Preparation and properties of soluble antigen-antibody complex (horseradish peroxidase- antihorseradish peroxidase) and its use in the identification of spirochetes. J Histochem Cytochem 18: 315-333. 1.970.
138. STTEENO O. J KNOPS. L DE CLERCK. A ADIMOELJA y H VAN DER VOORDE : Prevention of fertility disorders by detection and treatment of Varicocele at School and college age. Andrologia 8: 47-53. 1.976.
139. SWERDLOFF RS y PC WALSH : Pituitary and gonadal hormones in patients with Varicocele. Fertil Steril 26: 1006-1012. 1.975.

140. TAKA KM: Current aspects of Leydig cell function and its regulation. J Reprod Fert 78: 367-380, 1986.
141. TAHRI-JOUTEI A, MT LATRILLE y G POINTIS: The dynamics of the testosterone response of perfused mouse Leydig cells to HCG arginine vasopresin. Biochem Biophys Res Comm 146: 216-223, 1987.
142. TAYLOR CR. RJ KURMAN y NE WARNER : The potential value of immunohistologic technique in the classification of ovarian and testicular tumors. Hum Pathol 9: 417-427, 1978.
143. TERQUEM A y JP DADOUNE : Morphological finding in Varicocele: An ultrastructural study of 30 bilateral testicular biopsies. Int J Androl 4: 515-531, 1981.
144. TULLOCH WS: Varicocele in subfertility results of treatment. Br Med J 2: 356-358, 1955.
145. TURNER TT: Varicocele still an enigma. J Urol 129: 695-697, 1983.
146. UEHLING DT : Fertility in men with Varicocele. Int J Fertil 13: 58-60, 1968.

147. VAN SYED V, B KARPE, L PLOEN y EM RITZEN : Regulation of interstitial cell function by seminiferous tubules in intact and cryptorchid rats. *Int J Androl* 9: 271-284. 1.986.
148. VERMEULEN A y H VANDEWEGHE : Improved fertility after Varicocele correction: fact or fiction?. *Fertil Steril* 42: 249-256. 1.984.
149. VERSTOPPEN GR y OP STEENO : Varicocele and the pathogenesis of the associated subfertility. A review of the various theories. *Andrologia* 10: 85-102. 1.978.
150. VEIJOLA M y H RAJANIEMI: Luteinizing hormones activate in testicular interstitial fluid a factor(s) that increases the capillary permeability-a novel effect of hCG and LH. *Acta endocr Copenh Suppl* 270, 205. Abstr. 1985.
151. VOGT HJ, KM PIKKE y R SINTERMANN: Testosterone in peripheal plasma, spermatic veins and testicular tissues of patient with Varicocele. En: *Varicocele and male infertility*. Editado por EW Jecht y E Zeitler. Springer Verlag. Berlin: 102-105. 1982.

152. WEISS DB, L RODRIGUEZ-RIGAU, KD SMITH, A CHOWDHURY y E STEINBERGER: Quantitation of Leydig cells in testicular biopsies of oligospermic men with Varicocele. Fertil Steril 20: 305-312, 1.978.

153. WEISSBACH LM, HA HIENZ y OE RODERMUND : Spermatologische und histologische befunde bei patienten mit Varikocoele. Urologe A 14: 277-281, 1.975.

154. WEISSBACH L: Die idiopathische Varikocoele - Eine bersicht. Extracta Urol 1: 225-269, 1.978.

155. WING TY y AK CHRISTENSEN : Morphometric studies on rat seminiferous tubules. Am J Anat 165: 13-23, 1.982.

156. WOKALEK H: The Varicolcele: Clinical Aspects. En: Varicocoele and male infertility. Editado por EW Jecht y E Zeitler. Springer Verlag. Berlin: 13-18, 1982.

157. WONG TW y TM JONES: Evaluation of testicular biopsy in male infertility studies. En: Infertility in the male. Editado por LI Lipshultz y SS Howards. Churchill Livingstone. New York: 217-248, 1983.

158. YOSHIDA K, JA LANASA, J TAKAHASHI, SJ WINTERS, H OSHIMA y P TROEN : Studies of the human testis XVI. Evaluation of multiples indexes of testicular function in relation to advanced age, idiopathic oligospermia, or Varicocele. Fertil Steril 38: 712-720, 1.982.
159. ZORGNIOTTI AW y J Mc LEOD : Studies in temperature, human semen quality and Varicocele. Fertil Steril 24: 854-863, 1.973.
160. ZUKERMAN Z, LJ RODRIGUEZ-RIGAU, DB WEISS, AK CHOWDHURY, KD SMITH y E STEINBERGER : Quantitative analysis of the seminiferous epithelium in human testicular biopsies and the relation of spermatogenesis to sperm density. Fertil Steril 30: 448-455, 1978.